

Auswirkungen kortikaler Dysplasien im alternden Gehirn von Ratten

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae
(Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Martin Metzler
geboren am 30. November 1983 in Erfurt

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. Otto W. Witte
Klinik für Neurologie, Universitätsklinikum Jena
2. Prof. Dr. rer. nat. Christian Gaser
Klinik für Psychiatrie, Universitätsklinikum Jena
3. Prof. Dr. med. Ulf Eysel
Institut für Physiologie, Ruhr-Universität Bochum

Tag der öffentlichen Verteidigung: 03.08.2010

„Man muss das Unmögliche versuchen, um das Mögliche zu erreichen.“

Herrmann Hesse

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Kortikale Dysplasie
DAB	3'-3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
DBM	Deformationsbasierte Morphometrie
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
IHC	Immunhistochemie
IHI	Interhemispherielle Inhibition
M1	Primär motorischer Kortex
MRT	Magnetresonanztomografie
MW	Mittelwert
NeuN	<i>neuronal nuclear antigen</i>
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
PBS	Phosphat-gepufferte Normalsalzlösung
PFA	Paraformaldehyd
PMG	Paramikrogyrale Zone
RF	Rezeptives Feld
ROD	Relative optische Dichte
ROI	standardisiertes Auswertungsfeld (<i>Region of interest</i>)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
Sham	Tiere mit Scheinoperation
SYN	Synaptophysin
TBS	Tris-gepufferte Normalsalzlösung

INHALTSVERZEICHNIS

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung.....	3
3. Ziele der Arbeit.....	8
4. Methodik	9
4.1 Versuchstiere und experimentelles Design	9
4.2 Das Gefrierläsionsmodell	10
4.3 Verhaltensuntersuchungen	11
4.4 Morphologische Untersuchungen	14
4.5 Statistische Auswertung	21
4.6 Verwendete Antikörper und Lösungsansätze	22
5. Ergebnisse.....	24
5.1 Morphologie der CD	24
5.2 Verhaltensuntersuchungen	27
5.3 Morphologische Untersuchungen	33
6. Diskussion.....	49
6.1 Diskussion der Methoden	49
6.2 Diskussion der Ergebnisse	53
7. Schlussfolgerungen.....	62
8. Literatur- und Quellenverzeichnis	63
9. Anhang.....	68
9.1 Lebenslauf	68
9.2 Danksagung	69
9.3 Ehrenwörtliche Erklärung	70
9.4 Tabellen	71

1. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Frage, inwieweit fokale kortikale Fehlbildungen globale morphologische Auswirkungen in alternden Gehirnen haben und ob sich die Fehlbildungen im Verhalten widerspiegeln.

Tierexperimentell wurde männlichen Wistar-Ratten durch Gefrierläsionen unmittelbar nach der Geburt am Tag P0 rechtshemisphärisch eine Dysplasie innerhalb des sensomotorischen Kortex induziert. Die Untersuchungen wurden nach 3, 17 und 26 Monaten durchgeführt. Volumetrische Messungen erfolgten mittels Magnetresonanztomographie (MRT) und Bearbeitung der Datensätze nach dem Prinzip der Deformationsbasierten Morphometrie (DBM). Die vermessenen Gehirne wurden für immunhistochemische Untersuchungen aufgearbeitet. Der Leitertest diente zur Analyse läsions-bedingter Defizite der Lokomotion und Koordination der Pfoten.

Die am Tag P0 läsionierten Tiere entwickelten einen dreischichtigen dysplastischen Kortex innerhalb des rechten sensomotorischen Vorder- und Hinterpfotenareals. Bei Kontrolltieren verbesserte sich mit zunehmendem Alter die Lokomotion der Vorderpfoten im Gegensatz zu einer tendenziellen Verschlechterung der Hinterpfoten. Bei den 3 Monate alten Läsionstieren ließen sich keine Defizite im Verhalten nachweisen. Mit zunehmendem Alter etablierten die läsionierten Tiere einen beidseitig progressiven, jedoch linksbetonten Verlust der Vorderpfotenfunktion. Die Hinterpfotenfunktion wurde nur linksseitig schlechter. Die volumetrischen MRT-Messungen zeigten, dass die 26 Monate alten Ratten größere Gehirne als die 3 Monate alten Ratten hatten, jedoch arealspezifische Atrophien auftraten. Die Atrophie tritt am deutlichsten bilateral im visuellen Kortex und unilateral im motorischen Kortex auf. Läsionierte Tiere bildeten im Alter eine bilaterale Atrophie des Kortex und eine beidseitige Hypertrophie des Kleinhirns aus. Die immunhistochemischen Färbetechniken zeigten in jungen Läsionstieren eine beidseitig ausgeprägte Gliose im Neokortex. Im Thalamus von alten dysplastischen Ratten entwickelte sich eine bilateral verstärkte Anfärbbarkeit von Synaptophysin.

Unsere Befunde legen nahe, dass sich kortikale Fehlbildungen progressiv und erst im Alter negativ auswirken. Vermutlich ist es Jungtieren während der Lokomotion noch möglich, kortikale Defizite kompensatorisch über Regelkreise zwischen Kleinhirn, Thalamus und sensomotorischen Kortex auszugleichen. Umschriebene Hirnrindenfehlbildungen stellen demnach einen Risikofaktor für die Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen dar. Dieser Umstand bedarf weiterer experimenteller Aufarbeitung. Untersuchungen sind des Weiteren nötig, um die neuroanatomische Grundlage der Volumenveränderungen detaillierter aufzuklären.

2. EINLEITUNG

Auf der Grundlage von Hirnrindenentwicklungsstörungen entsteht eine Gruppe von heterogenen Krankheitsbildern, die unter dem Begriff der kortikalen Dysplasien (CD) subsumiert werden. Die Bedeutung von Hirnentwicklungsstörungen wird zunehmend im klinischen Alltag erkannt. Patienten mit CD werden vor allem im Rahmen fokaler, medikamentenrefraktärer Anfallsleiden auffällig. Die Prävalenz der CD in der Diagnose fokaler Epilepsien liegt zwischen 5 und 25 Prozent, abhängig vom Patientenkollektiv und den eingesetzten bildgebenden Verfahren (Bast et al. 2006). Die in vielen Fällen zu CD's assoziierte medikamentenrefraktäre Epilepsie manifestiert sich meist im ersten Lebensjahr, tritt aber auch bis zum 60. Lebensjahr auf (Bast et al. 2006). Eine klinische Einteilung der CD's unter Zuhilfenahme moderner radiologischer Diagnoseverfahren, pathologischer und histomorphologischer Befunde lässt sich auf der Basis von Zellproliferations-, Zellmigrations- und Organisationsstörungen vollziehen (Hagemann et al. 2000b). Entscheidend für die funktionelle Auswirkung und die klinische Symptomatik ist dabei die Lokalisation der kortikalen Malformation (Stafstrom 2006, Alonso-Nanclares et al. 2005). Bei symmetrischem bilateralem Auftreten liegt der Malformation in der Regel eine genetische Störung zugrunde (Walsh 1999). Fokale und sporadische CD's entstehen vor allem durch intrauterine Cytomegalievirus-Infektionen und noxische Reize (Stafstrom 2006).

Ein etabliertes Modell für die beschriebenen CD's stellt das kortikale Gefrierläsionsmodell dar. Erstmals 1977/78 beschrieben (Dvorak et al. 1978, Dvorak und Feit 1977), lassen sich mit diesem Modell die verschiedenen Dysplasieformen des Menschen sehr gut reproduzierbar studieren. Im Mittelpunkt steht eine durch Kälte verursachte traumatische Hirnschädigung im unreifen Gehirn und damit eine Störung der Hirnrindenentwicklung, resultierend in einem kortikalen Mikrosulkus. Abbildung 1 gibt einen Überblick über die Entwicklung einer experimentell erzeugten CD.

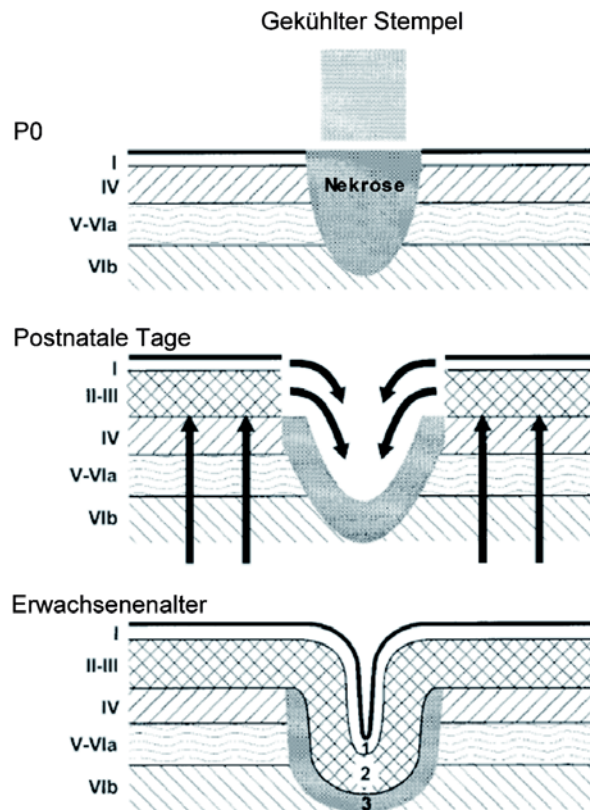


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Entwicklung des Mikrosulkus, modifiziert nach Redecker et al. 2000a. P0 = Tag der Geburt; Römische Ziffern kennzeichnen die den Mikrosulkus umgebenden Schichten, arabische Ziffern kennzeichnen die Schichten der fokalen Dysplasie. Eine durch die Gefrierläsion bedingte totale Nekrose findet sich in der weichen Hirnhaut und den Laminae I und IV des zum Zeitpunkt der Geburt unreifen Rattengehirnes. Die Schichten V und VIa sind nur teilweise nekrotisch, Schicht IVb wird die spätere Lamina IV des Mikrosulkus. Die Neuroblastenmigration findet nur bis zur Zone der totalen Nekrose statt (senkrechte Pfeile). Die neuroblastischen Dendriten bilden die Lamina I des Mikrosulkus, die Somata der Neuroblasten bilden Lamina II. Im weiteren Verlauf kolonisieren Gliazellen den Abschnitt mit partieller Nekrose und bilden Schicht III des Mikrosulkus.

Das Gefrierläsionsmodell wurde in den letzten zwei Jahrzehnten von verschiedenen Gruppen sehr differenziert untersucht. Dabei kamen neben immunhistochemischen und neuroanatomischen auch elektrophysiologische, autoradiografische und molekularbiologische Methoden zur Anwendung. Eine aktuelle Übersicht über die bisherigen Erkenntnisse zum Gefrierläsionsmodell findet sich bei Luhmann (Luhmann 2006).

Eine wichtige Rolle bei den pathophysiologischen Eigenschaften der kortikalen Gefrierläsion spielt die den Mikrosulkus umgebende Paramikrogyrale Zone (PMG). Untersuchungen zur Faserarchitektur ergaben eine stark veränderte Innervationsstruktur der PMG, welche durch eine umfangreiche Reorganisation einen wichtigen Beitrag zur Epileptogenität leistet (Giannetti et al. 1999, Giannetti

et al. 2000, Di Rocco et al. 2002, Di Rocco et al. 2001). Nach Luhmann et al. hat die PMG einen Radius von etwa 3,6 Millimetern (Luhmann und Raabe 1996).

Die Arbeitsgruppe um Fitch et al. demonstrierte für das Gefrierläsionsmodell Veränderungen in der akustischen Informationsverarbeitung (Herman et al. 1997, Fitch et al. 1994), wobei hier auch subkortikale neuroanatomische Abweichungen nachgewiesen werden konnten (Rosen et al. 1999, Herman et al. 1997). Signifikante Unterschiede in thigmotaktischen Untersuchungen bei Läsionstieren beschrieben Luhmann et al. in Mäusen mit Gefrierläsion im Unterareal für die Vibrissen (sog. Barrel-Kortex) des somatosensorischen Kortex (Luhmann et al. 2005). Die Lokomotion und das Explorationsverhalten waren hier unbeeinflusst. Nach unpublizierten Daten von Georg Hagemann aus unserer Arbeitsgruppe ließen sich bei Versuchstieren mit CD's in einem einfachen Zylindertest zur Überprüfung der Pfotenprävalenz keine funktionellen Defizite nachweisen. Rosen und Mitarbeiter führten mit Mäusen nach diesem Gefrierläsionsmodell verschiedenste Verhaltenstests durch (Rosen et al. 1995). Dabei waren deutliche Unterschiede zwischen Läsionstieren im Vergleich zu scheinoperierten Tieren festzustellen. So schnitten die Läsionstiere in einer modifizierten Morris Water Maze – Aufgabe und im Lashley Type III schlechter ab, als die scheinoperierten Tiere. Die beiden genannten Tests untersuchen das räumliche Lernvermögen (Rosen et al. 1995). In der gleichen Arbeit zeigten die Tiere mit kortikaler Dysplasie auch Schwächen im Diskriminationslernen (Rosen et al. 1995). Verhaltensuntersuchungen nach Gefrierläsionen im somatosensorischen Kortex und im Speziellen dem somatosensorischen Vorderpfotenareal liegen bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht vor. Außerdem wurden alle bisherigen Untersuchungen an jungen Versuchstieren durchgeführt.

Besonderes Augenmerk wurde in der vorliegenden Studie auf die gefrierläsionsbedingten Verhaltensänderungen von alten Versuchstieren gelegt. Eine Übersicht über die der Alterung des Gehirns zugrunde liegenden Mechanismen lieferten Burke et al. (Burke und Barnes 2006). Die am stärksten von den Alterungsprozessen betroffenen Hirnregionen sind der präfrontale Assoziationskortex und der Hippokampus. Besonders die Dysregulation des Ca^{2+} -

Stoffwechsel und der Synapsenverlust beeinträchtigen die Plastizität des Gehirns (Burke und Barnes 2006).

Befunde aus dem Humanbereich über lokale Volumenveränderungen in motorischen Arealen des Gehirns und deren Korrelation mit der motorischen Leistung in alten Individuen legen den Schluss nahe, dass eine Abnahme an grauer Substanz zu einer Beeinträchtigung der Balance und zu einer Gangverlangsamung führt (Rosano et al. 2007). Abbildung 2 stellt die Veränderung des Schrittmusters in alten Versuchsratten dar (Spengler et al. 1995).



Abbildung 2: Fußabdrücke laufender Ratten (Spengler et al. 1995).
 Linke Bildhälfte: Vorderpfoten einer jungen Ratte, Bildmitte:
 Vorderpfoten einer alten Ratte, Rechte Bildhälfte: Hinterpfoten einer
 alten Ratte.

In neueren Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass lokale traumatische Hirnschädigungen einen Einfluss auf das Gesamtvolumen des Gehirns, vor allem in gealterten Versuchstieren ausüben und direkte Evidenz für einen Zusammenhang zwischen traumatischen Hirnschädigungen und Neurodegeneration erbracht (Siren et al. 2006). Dabei kann die Volumenbestimmung des Gehirns anhand von MRT-Daten auf verschiedene Arten erfolgen. Einen umfassenden Überblick über diese Thematik findet sich bei Ashburner und Gaser (Gaser 2001, Ashburner 2004).

Es lassen sich zunächst manuelle und automatisierte Auswerteverfahren unterscheiden (Gaser 2001).

Bei der manuellen Volumenbestimmung werden zuvor festgelegte, standardisierte Auswertungsfelder (*Regions of interest*; ROIs) in aufeinanderfolgenden Schichten segmentiert und anschließend unter Einbeziehung der Schichtdicke die entsprechenden Volumina errechnet (Siren et al. 2006).

Automatisierte Verfahren nutzen im Gegensatz dazu Normalisierungsalgorithmen, um die methodischen Nachteile manueller Verfahren (Benutzerabhängigkeit, Zeitaufwand, Partialvolumeneffekte) auszugleichen (Gaser 2001). Dabei erfolgt die Transformierung der Gehirne im standardisierten Raum, um die Varianz einzelner Merkmale in jedem Voxel zu analysieren (Gaser 2001, Ashburner 2004). Die automatisierten Auswerteverfahren nutzen lineare und nicht-lineare Normalisierungsmethoden. Unter linearer Normalisierung versteht man die Anpassung von Größe und Ausrichtung der Bilder. Die morphometrische Auswertung erfolgt dann anhand von Grauwertunterschieden *voxel-by-voxel* (Ashburner und Friston 2000). Nicht-lineare Normalisierungen verwenden dahingegen die Anpassung lokaler morphologischer Unterschiede und ermöglichen die Auswertung von Deformationsfeldern (Gaser 2001).

Die wichtigsten automatisierten Auswerteverfahren sind somit die Voxelbasierte Morphometrie, die lineare Normalisierungsautomatismen verwendet und die Deformationsbasierte Morphometrie (DBM), welche mit nicht-linearen Normalisierungsalgorithmen arbeitet.

Mit der vorliegenden Studie wird erstmals eine tierexperimentelle Untersuchung zu altersabhängigen Folgen einer kortikalen Dysplasie vorgelegt. Daher liegt der Fokus dieser Arbeit vor allem auf alten Versuchstieren und beleuchtet eine mögliche pathogenetische Langzeitaktivität („*long-term pathophysiology*“, Pullela et al. 2006) einer direkt postnatal induzierten kortikalen Läsion und einem daraus resultierenden progredienten Gehirnvolumenverlust mit den Kennzeichen von neurodegenerativen Erkrankungen.

3. ZIELE DER ARBEIT

Die folgende tierexperimentelle Studie wurde durchgeführt, um den Einfluss einer direkt postnatal induzierten Gefrierläsion im sensomotorischen Kortex auf Änderungen des Verhaltens, der Neuroanatomie und des zerebralen Volumens in jungen und alten Wistar-Ratten zu untersuchen. Ein besonderer Schwerpunkt lag auf der Frage, ob sich CD's in alten Versuchstieren mit Zeichen neurodegenerativer Erkrankungen manifestieren. Die Etablierung der Magnetresonanztomografie als experimentelle Methode zur Bestimmung von Gehirnvolumenveränderungen in Ratten stellt einen Kernpunkt dieser Arbeit dar.

Es sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Verursachen kortikale Gefrierläsionen im sensomotorischen Kortex der rechten Hemisphäre lokomotorische und koordinatorische Defizite der Pfoten?
2. Inwiefern ändern sich dysplasie-bedingt Volumen und Morphologie des Gehirns?
3. Welche Langzeitfolgen ergeben sich durch die kortikalen Fehlentwicklungen?

4. METHODIK

Alle Versuche wurden unter Berücksichtigung des Tierversuchsgesetzes durchgeführt und erfolgten nach gültiger Tierversuchsgenehmigung (TVA-Reg.-Nr.: 02-01/05).

4.1 Versuchstiere und experimentelles Design

Alle Versuche wurden an männlichen Wistar-Ratten durchgeführt. Für diese Arbeit galten drei Monate alte Ratten als Jungtiere, 17 Monate alte Ratten als Tiere im mittleren Alter und 26 Monate alte Ratten als Tiere hohen Alters. Es erfolgte weiterhin eine Einteilung in drei Versuchsgruppen (Abb. 3): 1. Gruppe mit Gefrierläsion (Dysplasie), 2. Gruppe mit Scheinoperation (Sham) und 3. Gruppe mit unbehandelten Kontrolltieren (Kontrolle).

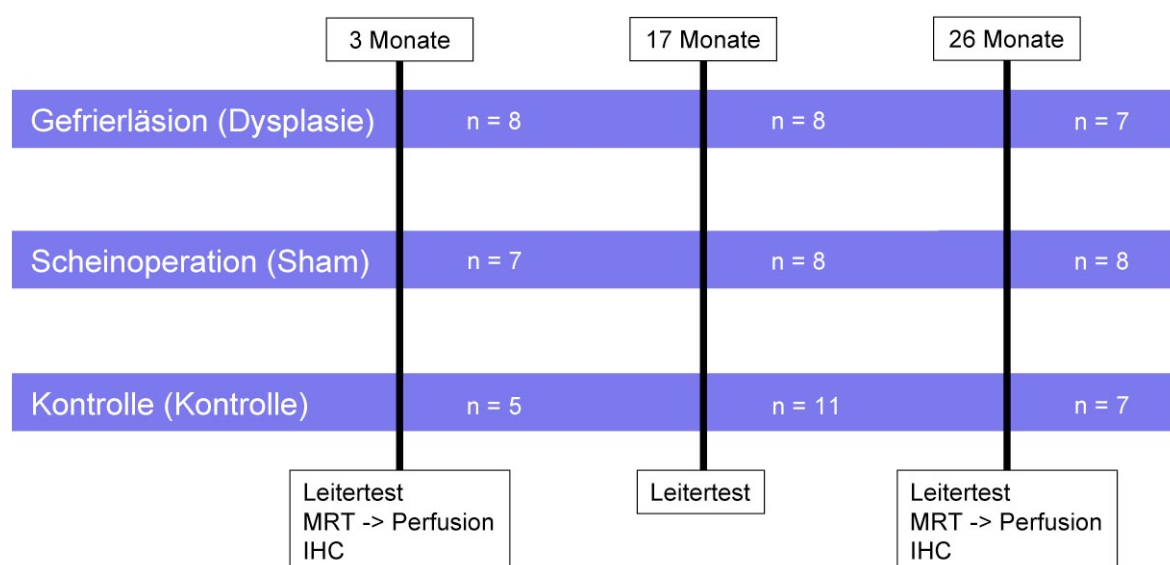


Abbildung 3: Das Schema gibt einen Überblick über die Versuchsgruppen und die durchgeführten Untersuchungen (n = Anzahl der Versuchstiere, IHC = Immunhistochemie, Perfusion = transkardiale Perfusion).

Die Ratten lebten im Institut für Versuchstierkunde in der Zweigstelle Dornburger Straße in Jena/Thüringen und waren in Standardkäfigen bei konstanten Bedingungen untergebracht. Der Lichtzyklus war 12:12 Stunden (Licht von 7:00 bis 19:00 Uhr), die Raumtemperatur betrug 22-24 °C und die relative Luftfeuchtigkeit 60 bis 80 %. Futter und Wasser (pH-Wert 2,5 bis 3,2) erhielten die

Tiere *ad libitum*. Die jungen adulten Tiere erreichten ein Gewicht von 280 bis 500 Gramm. Die alten Tiere hatten ein Gewicht von 450 bis 700 Gramm. In die Studie gingen Tiere mit unterschiedlichen Geburtszeitpunkten ein. So wurden im Mai 2005 die Versuchstiere für die 17 und 26 Monate alte Versuchsgruppe geboren, die 3 Monate alte Versuchsgruppe wurde nachträglich in die Versuche aufgenommen und im Mai 2007 geboren.

4.2 Das Gefrierläsionsmodell

Die neugeborenen Ratten wurden durch Lagerung auf Eis unterkühlt, was zu einer deutlichen Verminderung aller neuronalen Aktivität führte und einen narkotisierenden Effekt hatte. Die Tiere sind anschließend ohne Anwendung einer stereotaktischen Apparatur unter einem Binokular operiert wurden. Nach Desinfektion wurde die Kopfhaut im Bereich des parietalen Kortex mit einem Skalpell transversal über eine Länge von etwa 3 mm durchtrennt. Die Gefrierläsion wurde nach der von Dvorak (Dvorak & Feit, 1977; Dvorak et al. 1978) beschriebenen Methode durchgeführt. Dazu wurde ein Kupferzylinder von 1 mm Durchmesser mit flüssigem Stickstoff auf etwa -80°C gekühlt. Dieser Zylinder wurde dann in einen Mikromanipulator eingespannt und dessen Spitze unter visueller Kontrolle an 3 definierten Punkten für jeweils 5 Sekunden auf die Kalotte über dem parietalen Kortex gesetzt. Anschließend wurde die Wunde mit Acryl-Gewebekleber geschlossen und die neugeborenen Wistar-Ratten unter einer Rotlichtlampe aufgewärmt. Die Tiere wurden schließlich in der benutzten Streu des Käfigs gewälzt und zu dem Muttertier zurückgesetzt. Eine Scheinoperation (Sham) wurde genauso durchgeführt wie die eigentliche Gefrierläsionsoperation, jedoch mit dem Unterschied, dass der Kupferzylinder ungekühlt auf die Kalotte aufgesetzt worden ist.

4.3 Verhaltensuntersuchungen

4.3.1 Leitertest

Der Leitertest diente zur Bewertung lokomotorischer Fähigkeiten und gibt Auskunft über die Vorder- und Hinterpfotenplatzierung (Metz und Whishaw 2002). Die Aufgabe für die Tiere in diesem Experiment bestand darin, eine horizontale Leiter in 30 cm Höhe von einem neutralen Standardkäfig aus in ihren Heimatkäfig ohne Pause zu überqueren. Die Leiter hatte eine Länge von 1 m, war aus zwei transparenten Plexiglaswänden aufgebaut und enthielt 29 Metallsprossen, die in einem regulären und in einem irregulären Muster angeordnet werden konnten (Abb. 4). Der Mindestabstand zwischen zwei Sprossen betrug 1 cm. Die hier beschriebenen Versuche erfolgten mit dem irregulären Muster, wodurch sich Lerneffekte vermeiden ließen. Der Seitenplattenabstand betrug bei den Weibchen 9 cm und bei den Männchen 11 cm. Er wurde so gewählt, dass die Tiere noch ungefähr einen Zentimeter Abstand zu den Seitenwänden hatten, ein Umdrehen jedoch unmöglich war (Metz und Whishaw 2002). Im entsprechenden Versuchsalter wurden die Tiere zunächst an den Versuchsleiter und später an die Versuchsanordnung gewöhnt. Ziel dabei war es, dass jedes Tier im Training fünfmal erfolgreich die Leiter auf einem regulären Muster überquerte. Am darauf folgenden Tag absolvierten die Tiere während des eigentlichen Experiments hintereinander sieben Durchläufe auf dem unregelmäßigen Sprossenmuster. Die Analyse der Pfotenplatzierung erfolgte zwischen den Sprossen 8 bis 25. Bei einer Unterbrechung des Laufens wurden jeweils der letzte Schritt vor und der erste Schritt nach der Unterbrechung aus der Beurteilung ausgeschlossen.

Die einzelnen Durchläufe der Tiere wurden videografisch aufgezeichnet und im Nachhinein die Vorder- und Hinterpfotenplatzierung, die Schrittzahl, die Schrittlänge, die benutzten Sprossen, die Laufzeit, die Feinmotorik und die Koordination der Pfoten zueinander analysiert. Die qualitative Analyse erfolgte auf der Grundlage von Abbildung 5 und jeder Pfotenplatzierung wurde ein Score-Wert (Score) zugeordnet. Als Fehler galten die Kategorien 0 bis 2, die Kategorien 3 bis 6 stellten unterschiedliche Formen der Pfotenplatzierung dar. Die Anzahl der Fehler wurde im Ergebnisteil als Fehleranteil auf die Gesamtschrittzahl bezogen

und in Prozent ausgedrückt. Bei der Vergabe der Kategoriebewertung war darauf zu achten, dass auf die entsprechende Pfote das Gewicht verlagert werden musste, um einen Punktwert vergeben zu können.

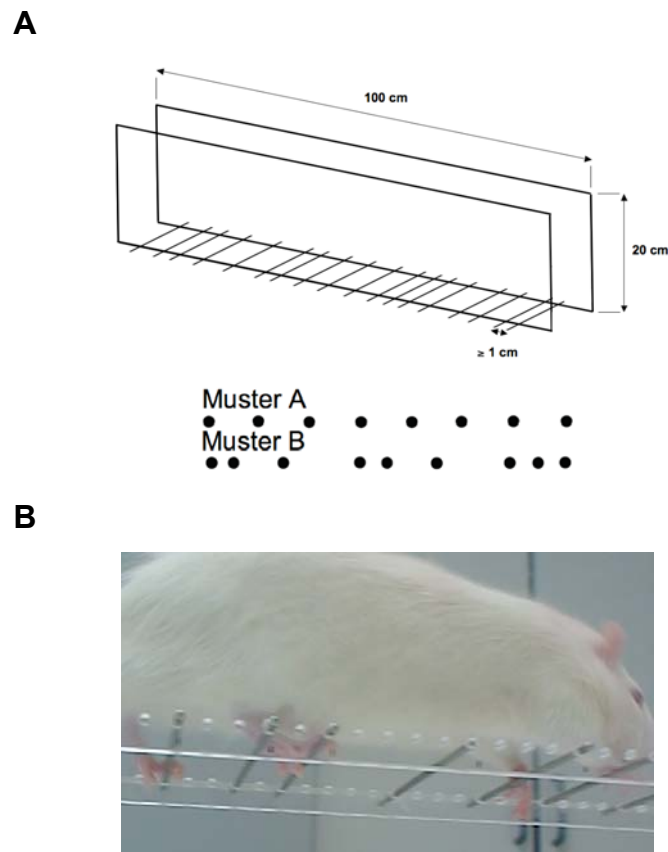


Abbildung 4: Der Leitertest bewertet sensomotorische Fähigkeiten. **(A)** Das Schema stellt die Leiter aus zwei parallel angeordneten 100 cm langen und 20 cm hohen Plexiglaswänden dar. Die Sprossen können in einem regulären (Muster A) und in einem irregulären Muster (Muster B) angeordnet werden. Die irreguläre Anordnung vermindert Lerneffekte. **(B)** Der Test wurde mit den Versuchstieren im Alter von 3, 17 und 26 Monaten durchgeführt und videografisch aufgezeichnet.

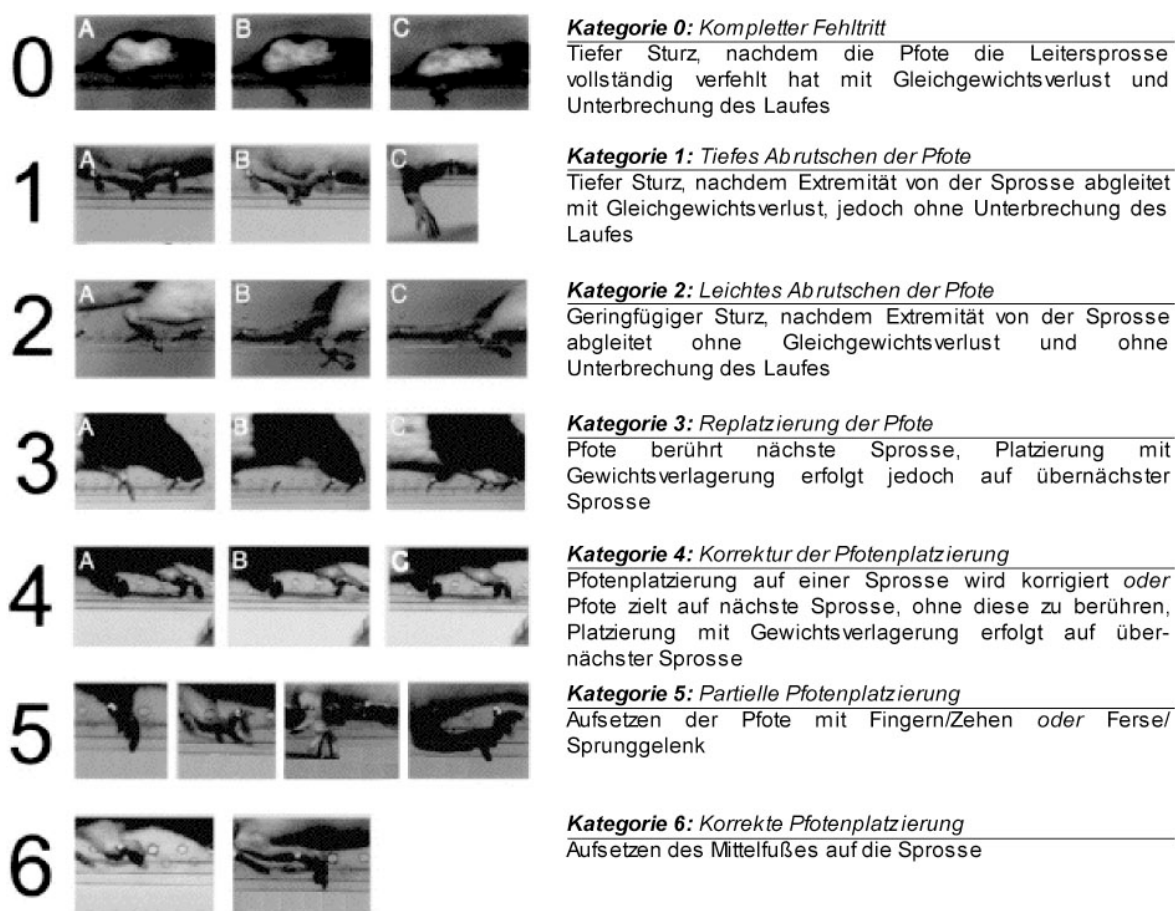


Abbildung 5: Pfootenscore (modifiziert nach Metz et al. 2002)

Bei Erreichen eines Scores von „6“ mit einer der beiden Vorderpfoten erfolgte die weitere Analyse der Feinmotorik anhand des so genannten „forepaw digit score“. Dabei steht eine „0“ für einen Winkel zwischen Zehen und dem Lot von ungefähr 30 Grad, eine „1“ für einen Winkel von 90 Grad und eine „2“ für ein vollständiges Umgreifen der Metallsprosse mit den Zehen (Metz und Whishaw 2002).

4.3.2 Greiftest



Abbildung 6: Vereinfachter Greiftest. Die Szene zeigt eine Versuchsratte beim Greifen von einem Standardpellet.

Für den Test der Händigkeit und des Greiferfolges der mittelalten Versuchstiere führten wir einen vereinfachten Greiftest durch. Nach Nahrungsdeprivation auf 50 % erfolgte über drei Tage eine Gewöhnung der Tiere an die Greifbox. In diesem Zeitraum mussten die Versuchstiere 100 Standardpellets (BioServ®, Dustless Precision Pellets 45 MG, USA) erfolgreich aufnehmen und

verzehren. Die Präsentation der Pellets erfolgte von der Mitte der Greifbox aus. Während des eigentlichen Versuchsablaufs wurden über drei Tage jeweils 20 Pellets dargereicht und der Greiferfolg analysiert. Das heißt, das Pellet musste beim ersten Versuch erfolgreich gegriffen und verzehrt werden (Abb. 6). Das Versuchstier saß lediglich in der Greifbox, eine Analyse des Bewegungsablaufes erfolgte nicht.

4.4 Morphologische Untersuchungen

Altersbedingte morphologische Veränderungen wurden einerseits mithilfe der Magnetresonanztomografie und andererseits mit immunhistochemischen Techniken untersucht.

4.4.1 MRT-gestützte Volumetrie

Zur Darstellung globaler zerebraler Volumenveränderungen in Folge einer postnatalen Gefrierläsion erfolgte eine MRT-gestützte Volumetrie. Die Untersuchungen wurden in Kooperation mit dem Institut für Diagnostische und Interventionelle Radiologie des Universitätsklinikums Jena am 3-Tesla MRT (Siemens-Magnetom-Trio) durchgeführt. Die Arbeitsabläufe im MRT erfolgten

unter keimarmen Bedingungen. Die Aufnahmen erfolgten auf einer speziell angefertigten Auflage mit zwei NORAS-Oberflächenspulen (Siemens AG, München; Abb. 7). An die linke Wange der Tiere legten wir einen Marker mit gadoliniumähnlichen Eigenschaften. Die Narkose erfolgte mit Isofluran als Inhalationsnarkose. Dabei war die Sauerstoffzufuhr auf drei Liter pro Minute eingestellt. Die Narkoseeinleitung erfolgte in der Regel mit 3 % Isofluran in reinem Sauerstoff und dauerte drei Minuten in einem Glaszylinder. Die Narkoseerhaltung erfolgte über eine Atemmaske mit einem Gemisch aus 1,7 % Isofluran und Sauerstoff. Eine Regulation der Narkostiefe erfolgte subjektiv durch eine manuelle Atemfrequenzüberwachung. Die Narkoseausleitung erfolgte mit reinem Sauerstoff. Anschließend wurden die Tiere zurück in ihre Käfige gesetzt. Die Gesamtnarkosedauer betrug ungefähr 50 Minuten je Tier. Die Tiere wurden während der Narkose mit Papiertüchern zugedeckt, um eine zu starke Auskühlung zu verhindern.

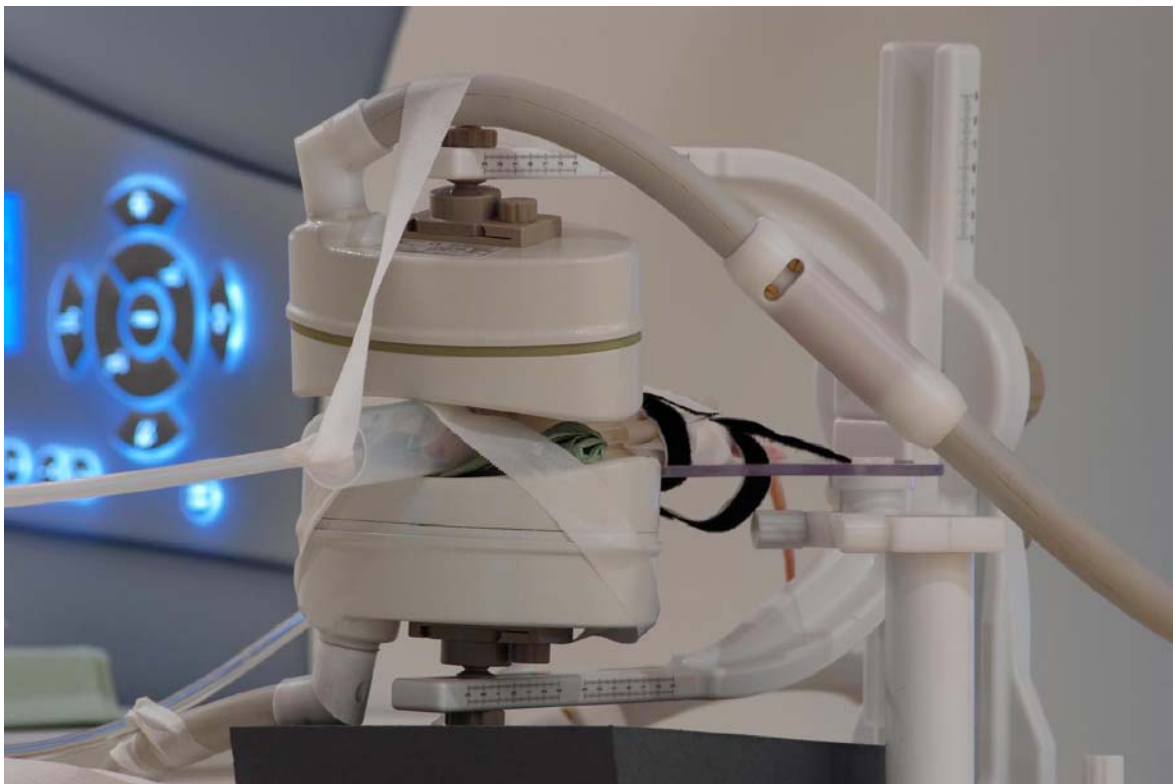


Abbildung 7: Versuchsaufbau im 3-Tesla Siemens-Magnetom-Trio. Der Kopf der narkotisierten, ventral liegenden Ratte ist zwischen zwei NORAS-Oberflächenspulen platziert. Im Hintergrund ist das MRT-Gerät zu sehen.

Für die Volumenbestimmungen wurde eine T2-Wichtung eingesetzt. Dabei vollzogen wir drei Einzelmessungen, die in einen isokubischen DICOM-Datensatz mit 120 Bildern gemittelt wurden (multiplanare Rekonstruktion). Noch am Scanner wurden die Daten manuell anhand der sagittalen Achse ausgerichtet. Die Aufnahmen wurden mit einer isotropen Auflösung von 0,3 Millimeter und einem variablen Flip-Winkel ($FA = 120^\circ$) in einer speziellen dreidimensionalen Volumensequenz (sog. SPACE, $TR = 2500\text{ ms}$, $TE = 356\text{ ms}$) durchgeführt.

Von jedem untersuchten Tier erhielten wir insgesamt 120 koronare Schnitte in einem Datensatz. Um eine Volumenbestimmung zu ermöglichen war es nötig, die DICOM-Dateien in eine binäre Form umzuwandeln und das Gehirn mittels Maske selektiv aus den kranialen Aufnahmen zu registrieren. Dazu bewährte sich ein selbst entwickelter, einfacher Algorithmus unter Verwendung von Makros mit der Software „ImageJ“ (*National Institutes of Health*). Damit lassen sich die Gehirne nach Verrechnung der isokubischen Ursprungsdaten mit den ebenfalls isokubischen binären Daten aus den kranialen MRT-Daten segmentieren. Der oben beschriebene Arbeitsgang wurde an vier repräsentativen Aufnahmen von Kontrolltieren vollzogen. Diese wurden dann in eine Maske (Segmentierungsschablone) umgerechnet und für die Weiterverarbeitung aufbereitet.

Die Auswertung der MRT-Daten erfolgte in Kooperation mit Prof. Dr. Christian Gaser vom Zentrum für Neuroimaging des Universitätsklinikums Jena. Um eine globale Analyse ohne vorherige Definition von Untersuchungsarealen (ROI) der Gehirnvolumina durchzuführen, wurden die mittels MRT gewonnenen Daten nach dem Verfahren der DBM mit dem Programm SPM5 (*Wellcome Department of Imaging Neuroscience*, London) ausgewertet (Abb. 8). Eine Beschreibung dieser Technik findet sich in den Arbeiten von Christian Gaser (Gaser et al. 1999, Gaser et al. 2001, Gaser 2001). Der erste Schritt dieser Methodik ist eine lineare Anpassung des Objektgehirnes an das selbst erstellte Referenzgehirn („*template*“). Lineare Anpassung meint die Angleichung von Ausrichtung und Größe. Der zweite Schritt der DBM ist die so genannte nichtlineare Angleichung zwischen Referenz- und Objektgehirn („*warping*“). Darunter versteht man lokale

Deformierungen des Objektgehirns, bis lediglich minimale Unterschiede zum Referenzgehirn bestehen. Die so entstandenen Deformationsfelder werden anschließend in jedem Voxel unter Zuhilfenahme multipler Regressionsverfahren analysiert. Informationen über Volumenveränderungen können aus den Deformationsfeldern mit Hilfe der Jacobischen Determinante für die mehrdimensionale Integralrechnung gewonnen werden.

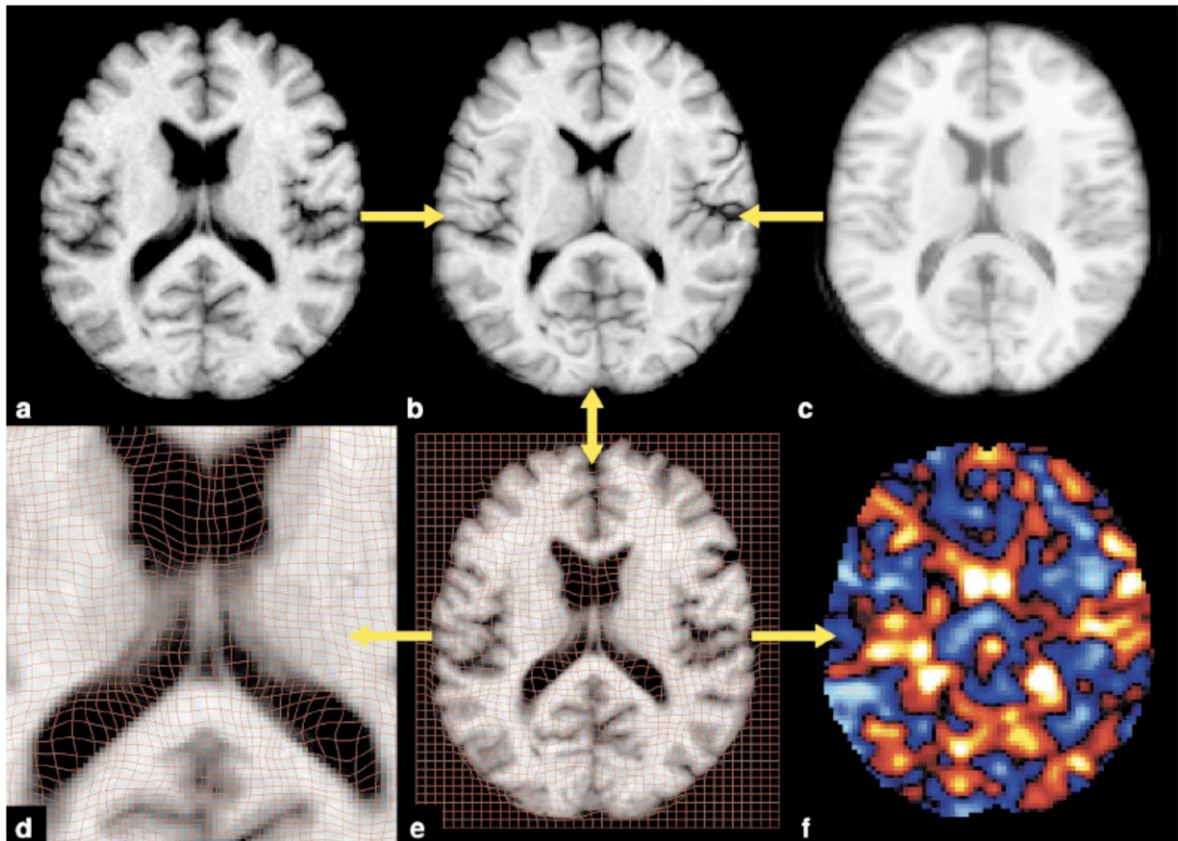


Abbildung 8: Beschreibung der DBM an einem Einzelbeispiel (Abb. aus Gaser et al. 2001). Bild a zeigt das in Ausrichtung und Größe an das Referenzgehirn (Bild c) angepasste Objektgehirn. Beim „warping“ werden die lokal bestehenden anatomischen Unterschiede durch Deformation minimiert (Bild b). Dies geschieht unter Verwendung von Deformationsgittern (Bild d und e). Volumenveränderungen lassen sich aus den Deformationsfeldern mit der Jacobischen Determinante errechnen. Das Ergebnis ist in Bild f dargestellt. Blaue Farbtöne kennzeichnen eine Volumenzunahme und rote Farbtöne eine Volumenabnahme.

Durch die Übertragung dieses Prinzips auf den histologischen Atlas des Rattengehirns von Paxinos und Watson war es möglich, die Volumina einzelner Hirnabschnitte quantitativ in Mikrolitern anzugeben und an geeigneten Regionen miteinander zu vergleichen (Paxinos und Watson 2005). Eine methodische

Validierung wurde durch die zweimalige Messung von fünf Tieren im Abstand von einer Woche durchgeführt.

4.4.2 Immunhistochemische Untersuchung

Für die Verarbeitung des Hirngewebes war es nötig, es in folgender Art und Weise zu fixieren: Nach tiefer Inhalationsanästhesie mit Ether und intraperitonealer Applikation von Ketamin wurden die Ratten auf dem Rücken in eine Perfusionsschale gelegt und an den Extremitäten fixiert. Die Eröffnung des Abdomens erfolgte durch einen Medianschnitt bis zum Sternum. Nach Durchtrennung der Rippen wurden der Thoraxraum und die in ihm gelegenen Organe freigelegt. Die Fixierung des Herzens erfolgte mit einer Klemme an den Herzkammern. Nach Punktion durch die Herzspitze und den rechten Herzvorhof wurde eine Kanüle in den linken Ventrikel eingeführt und bis in die *Aorta ascendens* vorgeschoben. Mit Hilfe einer Perfusionspumpe (505S, Matson-Marlow, England) wurden die Tiere mit einer kontinuierlichen Fließgeschwindigkeit von 30 ml/min für zwei Minuten mit gekühlter Phosphat-gepufferter Normalsalzlösung (PBS) und anschließend für 12 Minuten mit 4%iger Paraformaldehydlösung (PFA) perfundiert. Nach dem Ende der Perfusion erfolgte die Öffnung des Kраниums.

Nach sagittaler Durchtrennung des Skalps mit einem chirurgischen Messer wurde ausgehend vom *Foramen magnum* die Okzipitalschuppe mit einer Pinzette entfernt und der Schädelknochen beidseits in frontaler Richtung durchtrennt bis es möglich war, die Kalotte abzuheben. Im folgenden Arbeitsschritt wurde das Gehirn präpariert. Dazu wurde die *Dura mater* ebenfalls mit einer Pinzette von der Hirnoberfläche entfernt und das Gehirn mit einem gebogenen Spatel aus der Schädelgrube geborgen. Die fertig präparierten Gehirne wurden über Nacht in 4%iger Paraformaldehydlösung inkubiert. Zur Kryoprotektion erfolgte am nächsten Tag die Überführung in 10%ige Saccharose für drei bis 12 Stunden und bis zum Absinken auf den Gefäßboden für 24 bis 48 Stunden in 30%ige Saccharoselösung. Eine längere Aufbewahrung des Gewebes wurde dadurch

erreicht, dass es in Methylbutan bei -20 bis -25 °C eingefroren und bei -80 °C gelagert wurde. Am Gefrier-Schlittenmikrotom (Leica, Wetzlar) wurden vom gesamten Gehirn 40 µm dicke Koronarschnitte angefertigt und in Gefrierschutzlösung (Natriumazid) gelegt. Die Aufbewahrung erfolgte bei -20 °C.

Für die Untersuchung gefrierläsionsbedingter neuroanatomischer Veränderungen wurden immunhistochemische Färbungen mit den folgenden Antikörpern gegen entsprechende Proteine an jedem 12. Hirnschnitt durchgeführt: *neuronal nuclear antigen* (NeuN), *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) und Synaptophysin. Mit diesen gewählten Antigenen wurden drei Grundkomponenten zerebraler Plastizität (Markham und Greenough 2004) mit immunhistochemischen Färbungen erfasst.

Für eine Evaluierung des Mikrosulkus in läsionierten Tieren und um zusätzliche gravierende neuroanatomische Veränderungen/Pathologien vor allem in alten Versuchstieren auszuschließen, erfolgte die immunhistochemische Färbung mit NeuN. GFAP ist ein Intermediärfilamentprotein in Gliazellen oder in Zellen mit glialem Ursprung und wurde zur semiquantitativen Aufdeckung von Alterationen des glialen Systems genutzt. Eine erhöhte Immunreaktivität von GFAP ist außerdem ein Hinweis auf eine Gliose oder das Vorhandensein von aktivierten Astrozyten. Synaptophysin ist ein integrales membranständiges Glykoprotein in den präsynaptischen Vesikeln von Neuronen und neuroendokrinen Zellen und wurde zur Beurteilung der Synapsenfunktion ausgewählt. In Erkrankungen des dementiellen Formenkreises findet sich eine deutliche Reduktion dieses Proteins.

Mit Hilfe der Peroxidase-Technik wurden primär nicht sichtbare Strukturen dargestellt. Die Visualisierung erfolgte über eine Redoxreaktion des Chromogens 3'-3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) mit dem Katalysator Peroxidase zu einem dunkelbraunen Phenazinpolymer.

Zuerst wurden die in Gefrierschutzlösung aufbewahrten 40 µm dicken Schnitte in Tris-gepufferter Normalsalzlösung (TBS) sechsmal für jeweils 10 Minuten gewaschen. Zur Absättigung endogener Peroxidasen folgte eine Inkubation mit 0,6%igem Wasserstoffperoxid für 30 Minuten. Nach weiterem dreimaligen Waschen mit TBS wurden die Proben in die Blockierungslösung (TBS plus) für 30 Minuten überführt, welche entsprechend der primären Antikörper angepasst wurde (Tab. 1, Seite 22). TBS plus bestand aus den Grundkomponenten TBS,

Normalserum, 3 % Bovines Serumalbumin (BSA), 2 % Milchpulver und Triton X-100. Die entsprechenden Konzentrationsverhältnisse sind aus Tabelle 1 ersichtlich. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper, verdünnt mit TBS plus, bei 4 °C über Nacht auf einem Schüttler.

Für die Färbung des Synaptophysins war es nötig, eine Antigendemaskierung (= *Antigenretrieval*) vor den eigentlichen Färbeschritten durchzuführen. Dazu wurden die Schnitte in einen Zitratpuffer überführt und für 20 Sekunden bei 500 Watt in einer Mikrowelle erwärmt.

Am folgenden Tag wurden die Schnitte zunächst in TBS für 3 x 15 Minuten gewaschen und dann für 30 Minuten in TBS plus inkubiert. Nach diesem Schritt erfolgte die Inkubation mit dem biotinylierten sekundären Antikörper verdünnt in TBS plus bei Raumtemperatur auf dem Schüttler für zwei Stunden. Als nächstes wurden die Schnitte für 3 x 10 Minuten in TBS überführt. Die Inkubation mit ABC-Reagenz (Avidin Dehydrogenase/biotinylierte Peroxidase, Vectastain Elite Kit, Vector Laboratories, Burlingame, USA) wurde bei Raumtemperatur für eine Stunde durchgeführt. Jetzt folgte 3 x 15 minütiges Waschen in TBS. Die Zugabe von Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid-Wasserstoffperoxid-Lösung zu den Schnitten diente der Detektion der Antikörperreaktion. Hierbei wurde DAB oxidiert und Wasserstoffperoxid reduziert. Als Reaktionsprodukt entstand ein braunes, unstrukturiertes Phenazinpolymer. Nach einem sechsmaligen Waschvorgang in TBS wurden die gefärbten Schnitte mit Hilfe von 0,5%iger Gelatine auf Objektträger (Menzel-Gläser®, Braunschweig) aufgezogen. Abschließend wurden die getrockneten Objektträger durch das Aufbringen eines Deckglases (Menzel-Gläser®, Braunschweig) mit Toluol (Entellan® Merck, Darmstadt) konserviert.

Die immunhistologisch gefärbten Schnitte wurden mit dem Mikroskop Axioplan 2 (Zeiss) ausgewertet. Mit Hilfe der digitalen Kamera AxioCam (Zeiss) wurden die Bilder auf den Computer übertragen und mit der Software Axio Vision (Zeiss) dargestellt. Zur semiquantitativen Auswertung wurden die Schnitte auf einem helligkeitsstabilisierten Beleuchtungstisch mit einer CCD-Kamera (Hamamatsu) aufgenommen. Das analoge Kamerasignal wurde mit einem Video-Prozessor (Hamamatsu) verstärkt und mit einem MacIntosh-Computer digitalisiert. Mit Hilfe des Programms ImageJ (*National Institutes of Health*) konnten die Schnitte in Falschfarbenkodierung (Farbskala: 1 – 256) dargestellt werden. Das ermöglicht die Messung der relativen optischen Dichte (ROD) und die semiquantitative

vergleichende Auswertung der Immunreaktivität entsprechender Regionen mit dem Statistikprogramm SPSS. Die eigentliche Volumen- und ROD-Messung erfolgte mithilfe eines zuvor erarbeiteten Thresholdbereiches. Dieser wurde durch Mittelung der Minima und Maxima der ROD aller Schnitte gewonnen und durch das Erstellen eines Makros automatisiert für die Auswertung zur Anwendung gebracht. Die Volumenbestimmung erfolgte abzüglich der inneren Liquorräume.

4.5 Statistische Auswertung

Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) angegeben. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm SPSS 11.5. Die statistische Testung erfolgte für gepaarte Daten mit einem t-test für gepaarte Stichproben ($p < 0,05$). Ungepaarte, normalverteilte Stichproben wurden mit dem Student-t-Test für ungepaarte Stichproben ($p < 0,05$) getestet. Ungepaarte, nicht-normalverteilte Variablen wurden mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney Test getestet. Die Korrektur des α -Fehlers wurde mit dem Verfahren nach Bonferroni-Holm für normalverteilte Variablen durchgeführt.

4.6 Verwendete Antikörper und Lösungsansätze

Tabelle 1: Verwendete Antikörper und entsprechende Ansätze. *Für die Freilegung des entsprechenden Antigens war ein Antigen-Retrieval nötig. Dazu wurden die Schnitte in einen Zitratpuffer überführt und bei 500 Watt für eine Dauer von 20 Sekunden in einer Mikrowelle erwärmt.

Prim. Antikörper	Sek. Antikörper	Blockierungslösung
Mouse anti-NeuN (monoklonal) [CHEMICON] 1:500	Donkey anti-Mouse IgG (H + L) Biotin- SP-konjugiert [Jackson ImmunoResearch]	3 % NDS 3 % BSA 2 % MP 0,1 % Triton X-100
Mouse anti-GFAP (monoklonal) [CHEMICON] 1:2000	Donkey anti-Mouse IgG (H + L) Biotin- SP-konjugiert [Jackson ImmunoResearch]	10 % NDS 3 % BSA 2 % MP 0,1 % Triton X-100
Rabbit anti-Synaptophysin* (polyklonal) [CHEMICON] 1:8000	Goat anti-Rabbit IgG (H + L) Biotin-SP- konjugiert [Jackson ImmunoResearch]	10 % NGS 3 % BSA 2 % MP 0,1 % Triton X-100

Gelatine (0,5 %, zum Aufziehen der Schnitte)

- H₂O 200 ml
- Gelatine 1,0 g (Merck)
- Chrom-(III) Kaliumsulfat 0,1 g (Merck)
- auf 37 – 42 °C erwärmen

PBS (Phosphat gepufferte Normalsalzlösung)

- Phosphatpuffer mit H₂O auf 0,1 M verdünnen und 0,9 % NaCl hinzufügen

PFA 4 % (Paraformaldehyd-Lösung zur transkardialen Perfusion)

- PBS mit 4 % Paraformaldehyd (Riedel-deHäen)

Phosphatpuffer (0,2 M)

Stammlösung I (800 ml)

- Na₂HPO₄*2H₂O 28,5 g (Merck)

Stammlösung II (300 ml)

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 8,3 g (Merck)

Ansatz:

- Titration von 800 ml Stammlösung I mit Stammlösung II (ca. 200 ml) auf pH-Wert 7,4 ergibt Phosphatpuffer (0,2 M)

Saccharoselösung (10 bzw. 30 %ig)

- Saccharose 10 bzw. 30 g (Roth)

- PBS ad. 100 ml

Zitrat-Puffer (als Puffersubstanz beim thermischen Antigenretrieval)Stammlösung I (500 ml)

- Zitronensäure 10,5 g (Riedel-de-Häen)

Stammlösung II (500 ml)

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 17,8 g (Merck)

Ansatz:

- Titration von Stammlösung I mit Stammlösung II auf pH-Wert 4,5

5. ERGEBNISSE

5.1 Morphologie der CD

5.1.1 Gefrierläsionen am Tag P0 induzieren kortikale Dysplasien

Die Versuchstiere mit Gefrierläsion etablierten innerhalb der rechten Großhirnhemisphäre einen typisch ausgebildeten Mikrosulkus, wie er in Abbildung 9 illustriert wird.

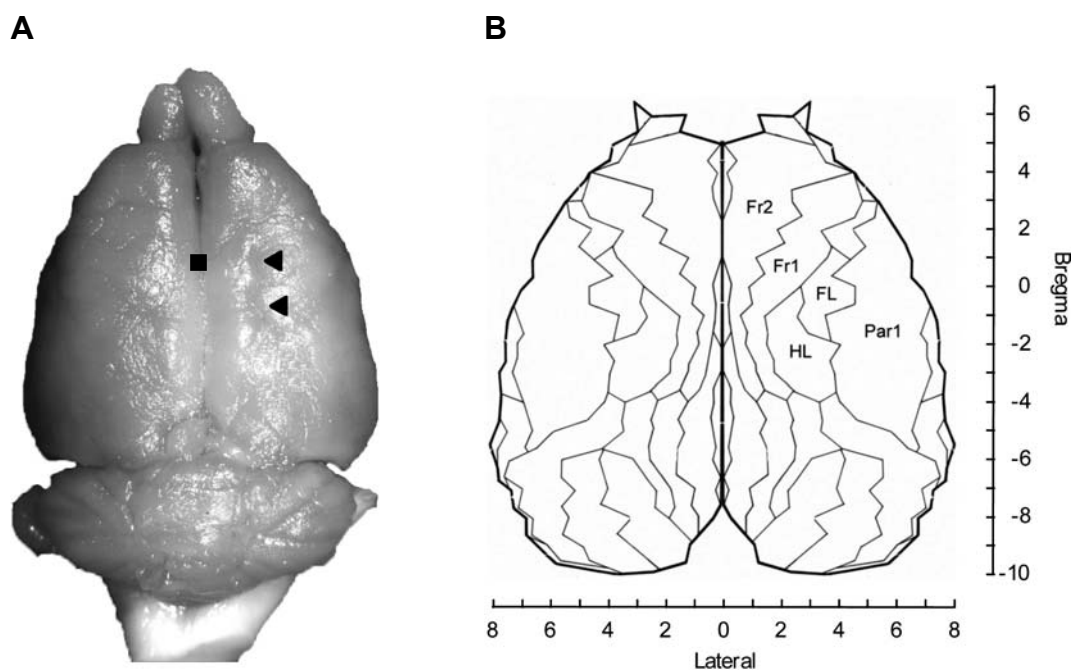


Abbildung 9: (A) Rattengehirn mit Gefrierläsions-induzierter Dysplasie. Die Pfeile markieren den Verlauf des Mikrosulkus auf der Kortexoberfläche. Das Quadrat gibt die Position von Bregma an. (B) Schematische Darstellung der Kortexareale nach Zilles (Zilles 1985). FL: Vorderpfotenareal des Somatosensorischen Kortex; HL: Hinterpfotenareal des Somatosensorischen Kortex; Fr1 und Fr2: frontale Assoziationskortex; Par1: parietaler Assoziationskortex.

5.1.2 Die Ausdehnung der CD

Wir nutzten die NeuN-Färbemethode zur Auswertung der Ausdehnung des Mikrosulkus und der Hirnschnittmorphologie der Läsions- im Vergleich zu den Sham- und Kontrolltieren (Abb. 10). Der Mikrosulkus ist dreischichtig laminiert (vgl. Abb. 1, Seite 4). Bei alten Versuchstieren zeigte die Dysplasie eine mittlere Ausdehnung von $5,90 \pm 0,69$ mm und bei den jungen Ratten von $7,12 \pm 0,43$ mm (Tab. 2). Die kortikale Dysplasie ist im MRT nicht eindeutig abgrenzbar (Abb. 11).

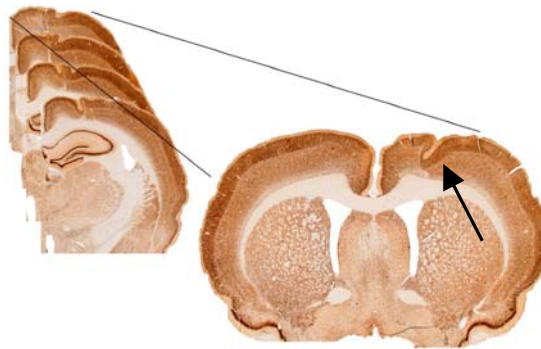


Abbildung 10: Fotomontage eines koronar geschnittenen und mit NeuN gefärbten dysplastischen Rattengehirns. Der Pfeil zeigt auf den rechtshemisphärischen Mikrosulkus.

Tabelle 2: Ausdehnung des Mikrosulkus. 26 Monate alte Läsionstiere: 26, 27, 29, 30, 52, 56 und 88; 3 Monate alte Läsionstiere: 309, 310, 311, 312, 313, 315 und 316.

Tier	Anfang [Bregma]	Ende [Bregma]	Sagittale Ausdehnung [mm]
26	+2,52	-4,92	7,44
27	+0,72	-4,92	5,64
29	+0,72	-3,48	4,20
30	+1,68	-5,64	7,32
52	+1,8	-2,52	4,32
56	+1,68	-2,28	3,96
88	+2,76	-5,64	8,40
309	+2,16	-6,12	8,28
310	+2,16	-5,4	7,56
311	+1,2	-4,56	5,76
312	+1,56	-3,73	5,29
313	+2,28	-5,4	7,68
315	+2,28	-5,16	7,44
316	+2,16	-5,64	7,80

5.1.3 Die Position des Mikrosulkus ist im MRT nicht eindeutig abgrenzbar

Die Abbildung 11 zeigt die MRT-Rohdaten von einem jungen und alten Läsionstier. Die Lage des Mikrosulkus ist nicht eindeutig abgrenzbar.

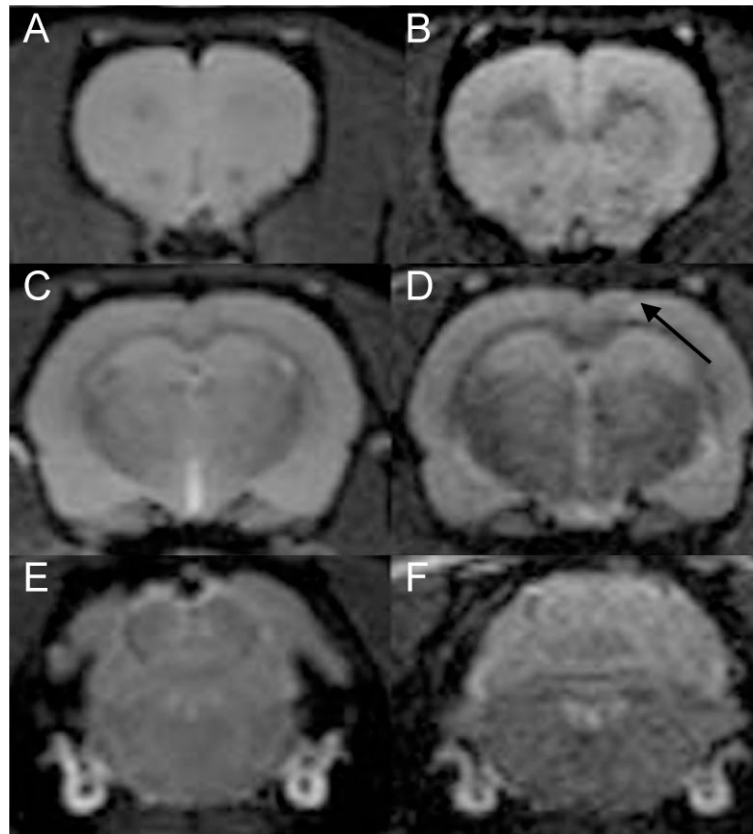


Abbildung 11: MRT-Rohdaten in neurologischer Aufsicht, T2-Wichtung. Die linke Bildhälfte entspricht der linken Körperhälfte einer Versuchsratte. A und B entsprechen Bregma +3,24 mm, C und D entsprechen Bregma -1,92 mm, E und F entsprechen Bregma -13,20 mm. **(A, C und E)** Kernspintomografische Koronarschnitte durch das Gehirn eines 3 Monate alten läsierten Versuchstieres. **(B, D und F)** Korrespondierende Schnitte einer 26 Monate alten läsierten Ratte. Der schwarze Pfeil zeigt auf die zu erahnende Gefrierläsion.

5.1.4 Die Gehirne von Kontrolltieren sind regelrecht ausgebildet

Bei den Sham- und Kontrolltieren zeigten sich keine neuroanatomischen Auffälligkeiten, die graue und weiße Substanz waren regelrecht ausgebildet.

5.2 Verhaltensuntersuchungen

5.2.1 Leitertest

Der Leitertest dient zur Bewertung lokomotorischer Fähigkeiten und gibt Auskunft über die Vorder- und Hinterpfotenplatzierung. Die Ergebnisse der scheinoperierten und unbehandelten Kontrolltiere wurden zu einer einheitlichen Kontrollgruppe zusammengefasst, da sie sich nicht statistisch signifikant voneinander unterschieden. Kontrolltiere zeigten in diesem Experiment mit zunehmendem Alter eine Verbesserung der Vorderpfotenfunktion, die Hinterpfoten erreichten demgegenüber im Alter tendenziell schlechtere Scorewerte. Im Alter von drei Monaten ließen sich zwischen Kontroll- und Läsionstieren keine Verhaltensunterschiede nachweisen. Die Läsionstiere zeigten jedoch mit zunehmendem Alter eine beidseitig progressive, linksbetonte Verschlechterung der Vorderpfotenfunktion. Die Hinterpfotenfunktion wurde dysplasie-bedingt linksseitig schlechter. Die Analyse der Feinmotorik und Laufzeit ergab keine statistisch gesicherten Unterschiede. Subjektive Beobachtungen der Versuchstiere während der Gewöhnung an die Testbedingungen ergaben zu allen Versuchszeitpunkten eine verminderte Ängstlichkeit der läsionierten Tiere.

Die Tabelle 3 und Abbildung 13 zeigen die jeweils erreichten Scorewerte des Leitertest je Versuchsgruppe. Ergänzend dazu geben Tabelle 4 und Abbildung 14 eine Übersicht der zugehörigen Fehleranzahl.

5.2.1.1 Das Schrittmuster von Ratten ist altersabhängig

Für die Schrittlänge stellten wir in allen Versuchsgruppen fest, dass sie mit zunehmendem Alter für die Vorderpfoten ab- und für die Hinterpfoten zunahm (Abb. 14).

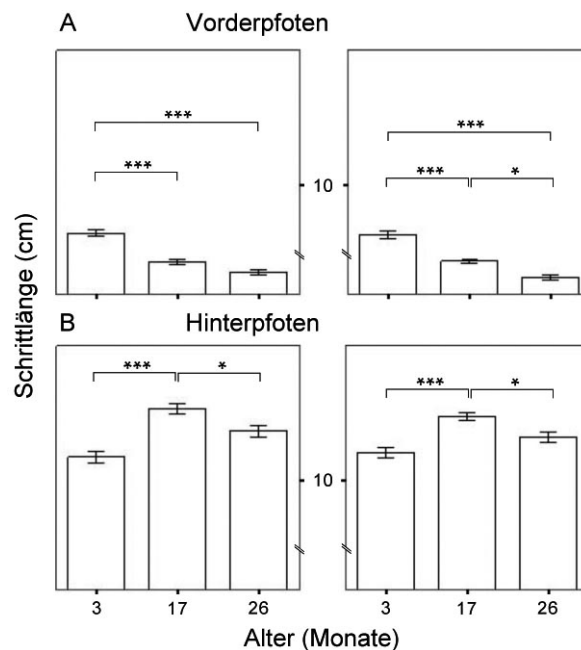


Abbildung 12: Schrittlänge von jungen, mittelalten und alten Kontrolltieren. **A, B)** Die linke Bildhälfte illustriert die linke Körperhälfte. Mit zunehmendem Alter waren eine Abnahme der Schrittlänge mit den Vorderpfoten und eine Zunahme der Schrittlänge mit den Hinterpfoten in Kontrolltieren nachweisbar. * = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$ (Mittelwert \pm SEM; Bonferroni-Holm-Korrektur)

5.2.1.2 Verbesserungen der Vorderpfotenfunktion mit zunehmendem Alter

Zwischen der jungen und alten Kontrollgruppe ergab sich eine statistisch signifikante Verbesserung für die linke und rechte Vorderpfote ($p < 0,001$ bzw. $p < 0,01$; Tab. 3). Das Scoreniveau der linken Vorderpfote der mittelalten Kontrolltiere, verglichen mit den jungen Kontrolltieren, war signifikant besser ($p < 0,01$). Die rechte Hinterpfote der alten Kontrollgruppe war im Vergleich zu den mittelalten Kontrollen signifikant schlechter ($p < 0,05$).

26 Monate alte Kontrollen begingen mit der rechten Hinterpfote mehr Fehler (Tab. 4), als 3 Monate alte Kontrollen ($p < 0,05$).

Tabelle 3: Pfotenscore des Leitertestes. ¹ in Monaten, ² Mittelwert \pm SEM

Alter ¹	Gruppe	l. Vorderpf. ²	r. Vorderpf. ²	l. Hinterpf. ²	r. Hinterpf. ²
3	Kontrolle	5,05 \pm 0,06	5,03 \pm 0,05	5,13 \pm 0,04	5,13 \pm 0,04
	Dysplasie	4,99 \pm 0,06	4,95 \pm 0,05	5,11 \pm 0,06	5,19 \pm 0,05
17	Kontrolle	5,19 \pm 0,04	5,23 \pm 0,04	5,07 \pm 0,05	5,14 \pm 0,04
	Dysplasie	4,92 \pm 0,09	5,06 \pm 0,05	4,80 \pm 0,10	5,06 \pm 0,08
26	Kontrolle	5,30 \pm 0,04	5,25 \pm 0,03	4,97 \pm 0,04	4,93 \pm 0,05
	Dysplasie	4,56 \pm 0,06	4,98 \pm 0,06	4,58 \pm 0,09	4,98 \pm 0,06

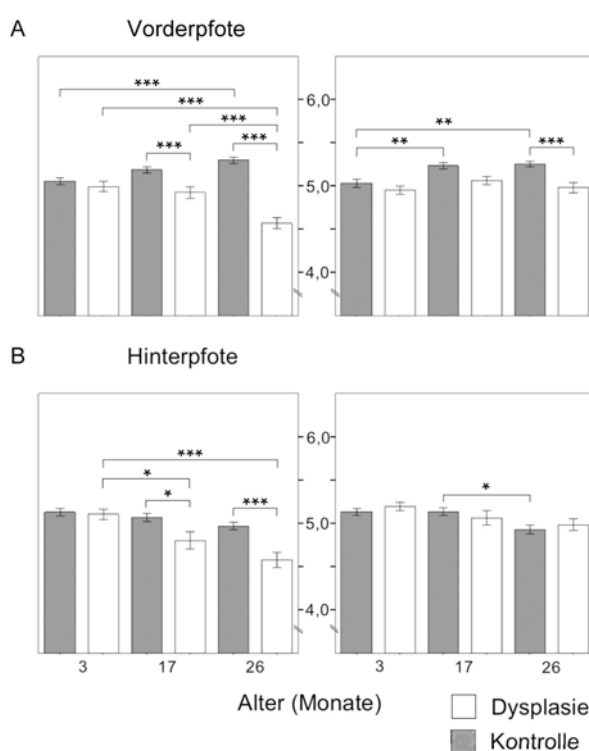


Abbildung 13: Pfotenscore (Leitertest). **A,B)** Die linke Abbildungshälfte entspricht der linken Körperhälfte der Versuchstiere. Lokomotorische Fähigkeiten sind in mittelalten und alten unbehandelten Versuchstieren besser ausgebildet als in Jungtieren. Mittelalte und alte Läsionstiere zeigten einen linksbetonten progressiven Funktionsverlust für die Vorder- und Hinterpfoten. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ (Mittelwert \pm SEM; Bonferroni-Holm-Korrektur)

5.2.1.3 Dysplasie-bedingter, progressiver Funktionsverlust der Pfoten im Alter

Die linke Vorderpfote der mittelalten Läsions- und Kontrolltiere unterschieden sich statistisch bedeutsam ($p < 0,001$), ebenso die linken Hinterpfoten ($p < 0,05$). Die linke Hinterpfote der mittelalten Läsionstiere ist signifikant schlechter, als die der jungen ($p < 0,05$). Eine statistisch gesicherte Verschlechterung der linken Vorderpfote ergab sich zwischen jungen und alten ($p < 0,001$) und zwischen mittelalten und alten Läsionstieren ($p < 0,001$). Zwischen alten Dysplasie- und Kontrolltieren bestand für die linke Vorderpfote ebenfalls ein statistisch bedeutsamer Unterschied ($p < 0,001$). Die rechte Vorderpfote der 26 Monate alten Kontrollen ist signifikant besser, als die der alten Dysplasietiere ($p < 0,001$).

Die linke Hinterpfote der alten Läsionstiere war statistisch gesichert schlechter, als die der jungen Läsionstiere ($p < 0,001$). Außerdem schnitten die alten Läsionstiere mit der linken Hinterpfote schlechter ab, als die alten Kontrolltiere ($p < 0,001$).

Die linke Hinterpfote der mittelalten Läsionstiere verursachte mehr Fehler, als die der jungen Läsionstiere ($p < 0,01$) und als die der mittelalten Kontrolltiere ($p < 0,01$). Die alten Läsionstiere begingen mit ihrer linken Hinterpfote mehr Fehler, als die jungen Läsionstiere ($p < 0,01$) und als die 26 Monate alten Kontrolltiere ($p < 0,05$).

Tabelle 4: Fehleranteil des Leitertestes in Prozent. ¹ in Monaten, ² Mittelwert \pm SEM

Alter ¹	Gruppe	l. Vorderpf. ²	r. Vorderpf. ²	l. Hinterpf. ²	r. Hinterpf. ²
3	Kontrolle	1,12 \pm 0,59	1,53 \pm 0,80	2,89 \pm 0,77	1,67 \pm 0,57
	Dysplasie	0,87 \pm 0,63	2,59 \pm 1,32	2,89 \pm 0,77	2,39 \pm 0,81
17	Kontrolle	1,67 \pm 0,49	1,57 \pm 0,40	3,15 \pm 1,25	3,96 \pm 0,87
	Dysplasie	3,69 \pm 1,53	2,34 \pm 0,77	11,22 \pm 2,12	7,27 \pm 1,93
26	Kontrolle	0,91 \pm 0,43	0,62 \pm 0,24	4,96 \pm 1,05	6,65 \pm 1,51
	Dysplasie	2,47 \pm 1,01	2,44 \pm 1,40	12,15 \pm 3,04	3,98 \pm 1,14

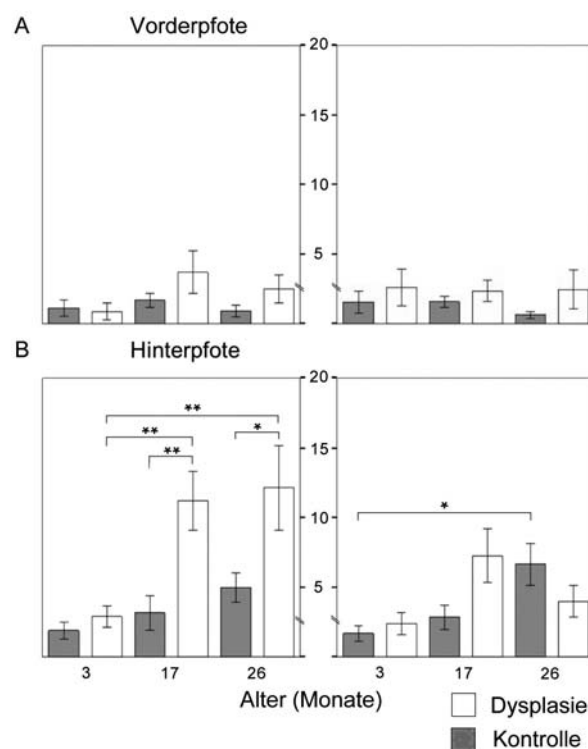


Abbildung 14: Fehleranteil in Prozent (Leitertest). **A,B)** Die linke Abbildungshälfte entspricht der linken Körperhälfte der Versuchstiere. Mittelalte und alte Läsionstiere zeigten eine Zunahme der Fehlerhäufigkeit mit der linken Hinterpfote. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; (Mittelwert \pm SEM; Bonferroni-Holm-Korrektur)

5.2.2 Die kortikale Dysplasie beeinflusst die Vorderpfotenprävalenz

Die Testung der Händigkeit ausgewählter Versuchstiere im Alter von 17 Monaten erfolgte mit dem Greiftest, um einen Einfluss der Gefrierläsion auf die Vorderpfotenprävalenz der Tiere zu untersuchen. Aus der Dysplasiegruppe zeigten sieben Tiere eine Prävalenz für die linke Vorderpfote und drei Tiere für die rechte Vorderpfote. In der Kontrollgruppe benutzten drei Tiere vor allem die linke Vorderpfote und sieben Tiere die rechte Vorderpfote (Abb. 15). Statistisch signifikante Unterschiede ließen sich nicht ermitteln.

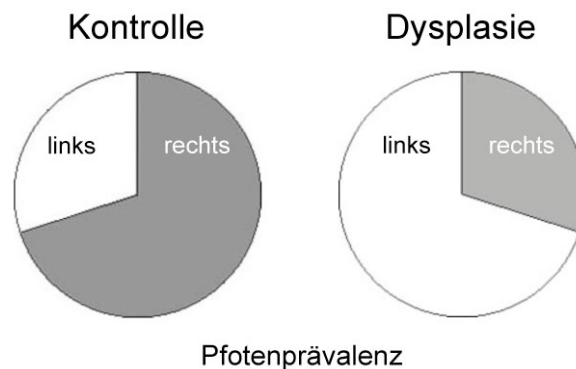


Abbildung 15: Vorderpfotenprävalenz der Kontroll- und Dysplasiegruppe. 70 Prozent der Kontrolltiere bevorzugten die rechte und 70 Prozent der Läsionstiere die linke Vorderpfote.

5.3 Morphologische Untersuchungen

Sham- und Kontrolltiere wurden aufgrund fehlender statistisch signifikanter Unterschiede als Kontrolltiere zusammengefasst und –abgebildet.

5.3.1 Etablierung der deformationsbasierten Morphometrie an Ratten

Kraniale MRT-Messungen wurden mit einer speziellen Volumensequenz in T2-Wichtung durchgeführt. Für jedes Tier führten wir drei Messungen mit anschließender Mittelung durch. Die Entwicklung des Auswertalgorithmus erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Christian Gaser vom Zentrum für Neuroimaging des Universitätsklinikums Jena (Abb. 16) und beinhaltete die Konstruktion einer Segmentierungsmaske. Mit dieser war es möglich, die Gehirne selektiv aus den MRT-Datensätzen zu extrahieren. Die Entwicklung eines Ratten-MRT-Atlas nach Paxinos ermöglicht arealspezifische, quantitative Aussagen über Volumenveränderungen (Paxinos und Watson 2005). Durch Testung der normalisierten MRT-Daten auf Homogenität („*Check sample homogeneity*“) konnten Bilder mit schlechter Qualität oder Artefakten, sowie Ausreißer identifiziert werden. Das Referenzgehirn wurde aus den MRT-Messungen von insgesamt 36 Ratten, darunter alle in die Studie einbezogenen Tiere, konstruiert (Abb. 16 F).

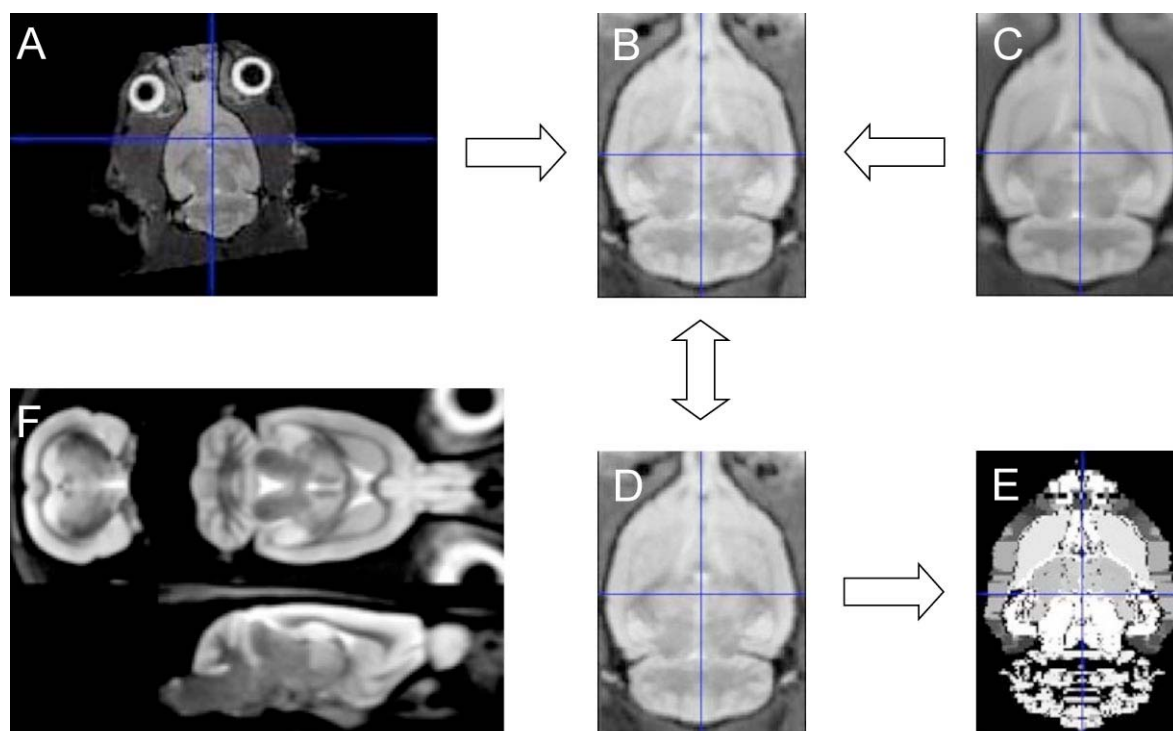


Abbildung 16: Flussdiagramm zur Beschreibung des Arbeitsablaufes der DBM. **(A)** Axiales DICOM-Bild des Objektgehirns. **(B)** In Ausrichtung und Größe auf das Referenzgehirn **(C)** normalisiertes Gehirn. **(D)** Beim „warping“ werden die lokal bestehenden anatomischen Unterschiede zwischen Objekt- und Referenzgehirn minimiert. **(E)** Volumenveränderungen lassen sich mit Hilfe der Jacobi-Determinante für die Integralrechnung im dreidimensionalen Raum anhand des MRT-Ratten-Atlas nach Paxinos arealspezifisch berechnen. Dabei werden die lokalen Deformationen, welche für die nichtlineare Angleichung des Objekt- an das Referenzgehirn nötig waren, innerhalb der Versuchstiere einer Experimentalgruppe zusammengefasst und zwischen den Testgruppen analysiert (SPM: „statistical parametric mapping“) und mithilfe von „blobs“ auf die MRT-Datensätze projiziert. **(F)** Mittelung der MRT-Rohdaten zum Referenzgehirn in koronarer, transversaler und sagittaler Schnitfführung.

Die Validierung der volumetrischen MRT-Messung und des DBM-Auswertealgorithmus erfolgte durch Wiederholungsmessungen an fünf jungen Kontrolltieren im Abstand von sieben Tagen. Vergleichende Volumenbestimmungen des Gesamtvolumens der Großhirn- und Kleinhirnhemisphären zeigten keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen beiden Messzeitpunkten (Tab. 5).

Tabelle 5: Wiederholte MRT-Messung im Abstand von 7 Tagen. Die wiederholte volumetrische MRT-Messung im Abstand von sieben Tagen erbrachte keine statistisch gesicherten Unterschiede zwischen den beiden Messzeitpunkten je Tier. Hem (L) = linke Großhirnhemisphäre, Hem (R) = rechte Großhirnhemisphäre, C-Hem (L) = linke Kleinhirnhemisphäre, C-Hem (R) = rechte Kleinhirnhemisphäre. * Nomenklatur: 1_NAME = 1. Messung Tier „NAME“, 2_NAME = 2. Messung Tier „NAME“. ¹ in Mikroliter.

Name*	Hem (L) ¹	Hem (R) ¹	C-Hem (L) ¹	C-Hem (R) ¹
1_334	1163,9	1188,4	110,1	127,5
2_334	1207,3	1208,1	112,0	125,5
1_335	1154,0	1179,0	106,1	127,8
2_335	1179,9	1201,6	104,5	130,7
1_353	1279,1	1281,8	120,2	131,8
2_353	1223,4	1241,6	115,4	137,8
1_354	1267,8	1268,4	116,1	126,7
2_354	1269,7	1265,9	117,0	127,1
1_355	1302,0	1304,0	93,9	116,6
2_355	1223,4	1241,6	115,4	137,8

5.3.2 *In vivo*-Quantifizierung des zerebralen Volumens

5.3.2.1 Alte Rattengehirne zeigten arealspezifisch Volumenzu- oder -abnahmen

Das Gesamtgehirnvolumen war in 26 Monate alten Kontrolltieren größer als in 3 Monate alten Tieren (Abb. 17 und 18). Die alten Tiere zeigten eine Volumenabnahme im visuellen (Abb. 18 A: Reihe 2, Säule 5-7; Reihe 3, Säule 1-2, rot dargestellt) und frontoparietalen (Abb. 18 B: Reihe 2, Säule 5-7; Reihe 3, Säule 1-7; Reihe 4, Säule 1-6) Kortex. Volumenzunahmen ließen sich im auditorischen (Abb. 18 A: Reihe 5, Säule 6-7) und piriformen (Abb. 18 A: Reihe 3-6, Säule 1-7) Kortex, aber auch subkortikal in den Basalganglien (Abb. 18 A: Reihe 4/5, Säule 1-7) und im Bereich des Thalamus (Abb. 18 B: Reihe 3, Säule 1-7) nachweisen. Die Volumenveränderungen sind teilweise asymmetrisch ausgebildet.

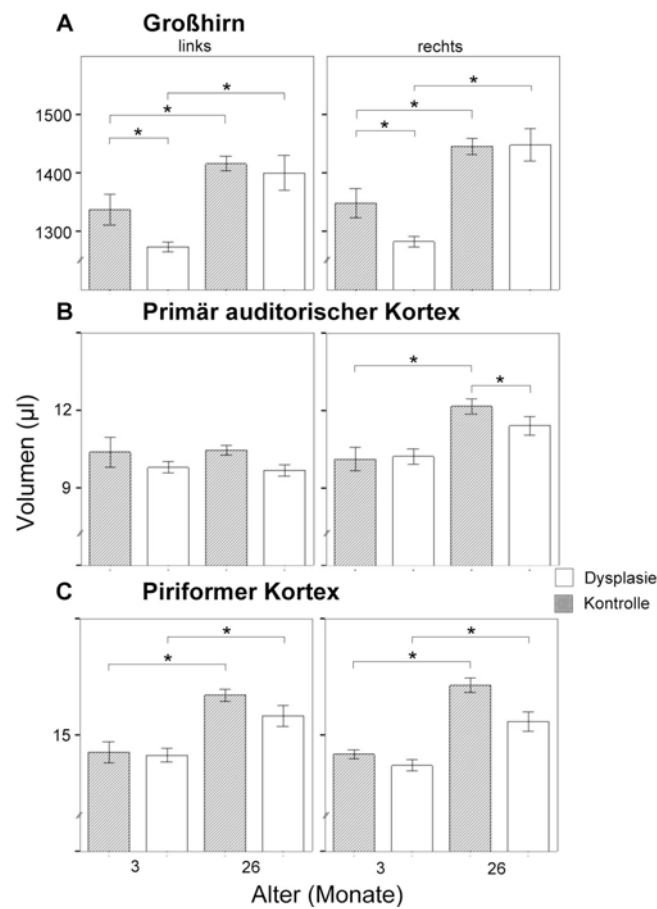


Abbildung 17: Altersbedingte Volumenveränderungen in Kontrolltieren. Quantitative Darstellung von Volumenveränderungen der Großhirnhemisphären, des Auditorischen und Piriformen Kortex in Mikrolitern. Das Gesamtvolumen der Großhirnhemisphären nimmt mit zunehmendem Alter zu. Ebenso konnte mit steigendem Lebensalter eine Volumenzunahme des Auditorischen und Piriformen Kortex nachgewiesen werden (* $p < 0,05$, Mittelwert \pm SEM, Student-TTEST).

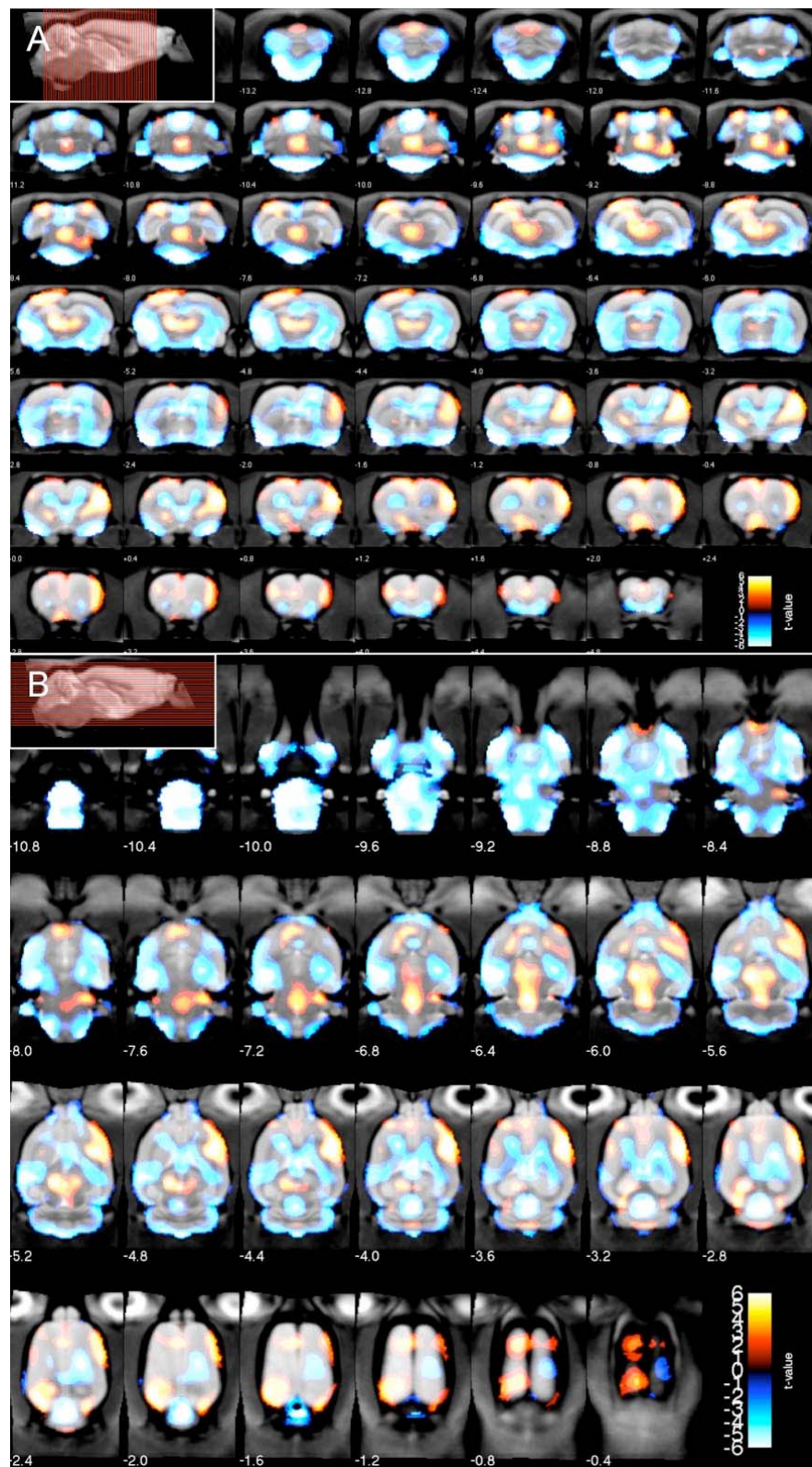


Abbildung 18: Altersbedingte Volumenveränderungen in (A) koronarer Schnittebene und in (B) axialer Schnittebene. Die linke Bildhälfte entspricht der linken Körperhälfte. Verglichen sind in dieser Abbildung junge und alte Kontrolltiere. Die Farbskala gibt das Signifikanzniveau der lokalen Volumenunterschiede wieder: rote Farbtöne = Volumenabnahme; blaue Farbtöne = Volumenzunahme (Erläuterungen unter 5.3.2.1, Seite 36).

5.3.2.2 Dysplasie-bedingter Gewebsverlust im jungen Tier

Die Induktion der Gefrierläsion führt zu einem diffusen Substanzverlust, der nicht auf den Ort der CD beschränkt ist. Volumenabnahmen fanden sich bei jungen dysplastischen Tieren vor allem rechtsbetont im parietalen Kortex (Abb. 19; Abb. 20 A: Reihe 3-5, Säule 1-7), im Hippokampus (Abb. 20 B: Reihe 3/4 und Säule 2-7) und im Primär visuellen Kortex (Abb. 20 A: Reihe 3) Demgegenüber zeigte sich eine Volumenzunahme in der zur Gefrierläsion korrespondierenden Kleinhirnhemisphäre (Abb. 20 B: Reihe 3, Säule 3-7).

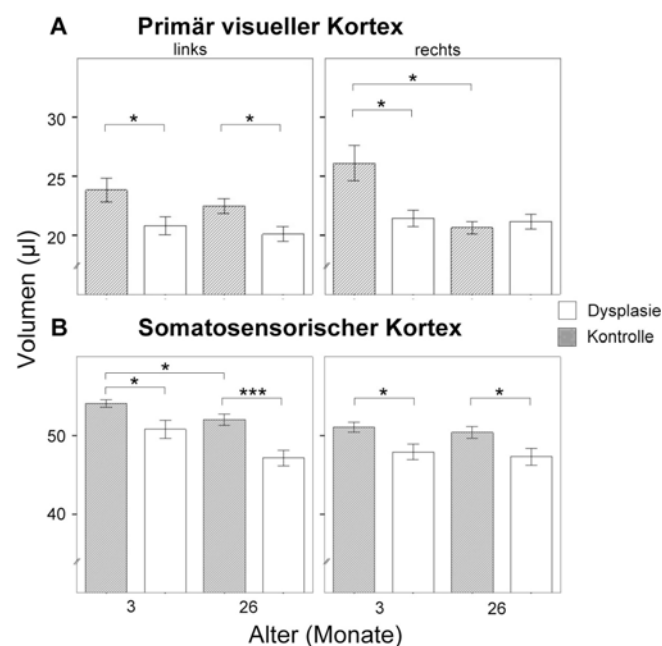


Abbildung 19: Volumenveränderungen in jungen Dysplastietieren. Darstellung des quantitativen Gehirnvolumens in Mikrolitern (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; Mittelwert \pm SEM, Student-TTEST). Zu diesem Zeitpunkt sind besonders die Volumenabnahmen des Somatosensorischen und Visuellen Kortex hervorzuheben.

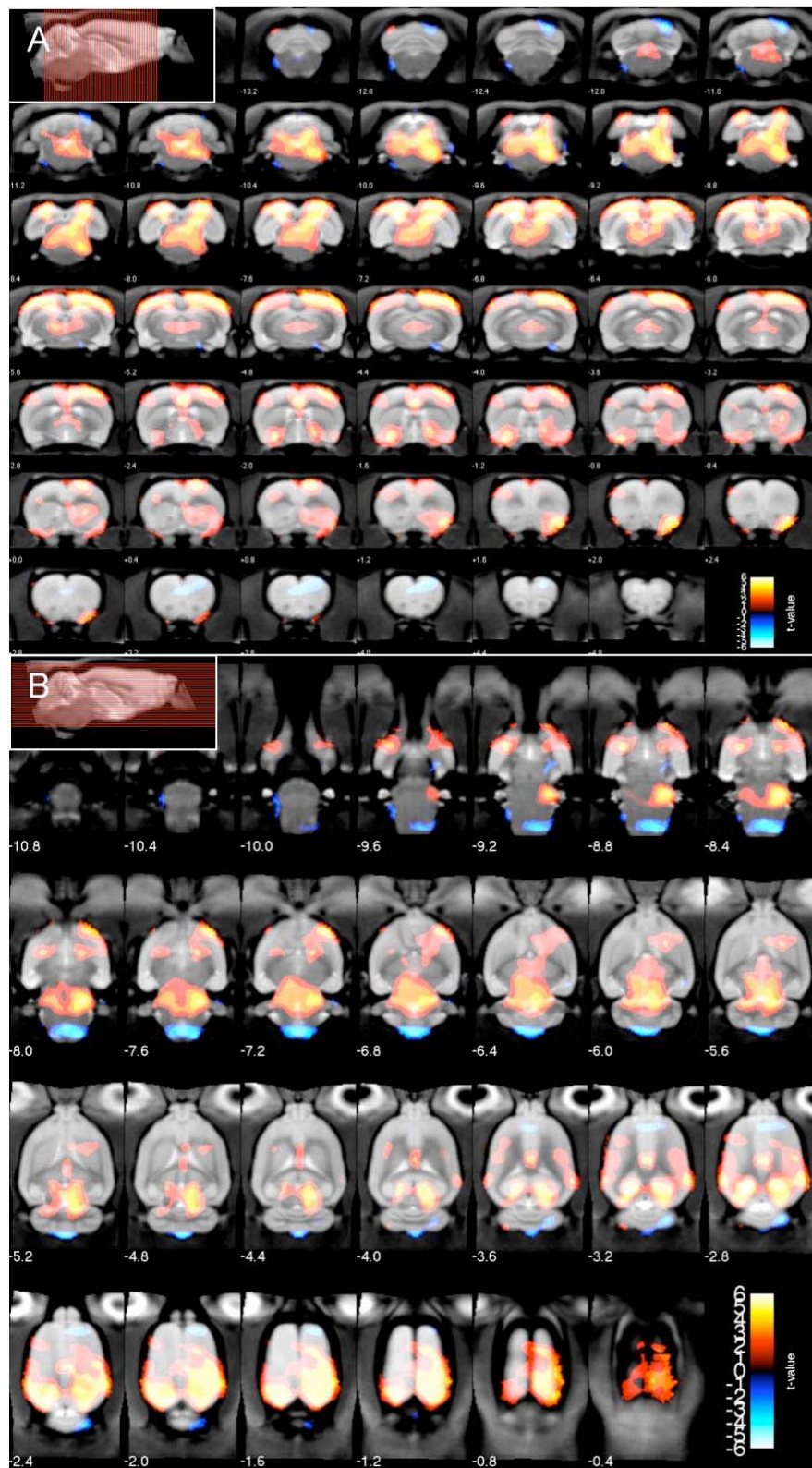


Abbildung 20: Dysplasie-bedingte Volumenveränderungen junger Versuchstiere in (A) koronarer Schnittebene und in (B) axialer Schnittebene. Der linken Bildhälfte entspricht die linke Körperhälfte. Die Abbildung vergleicht junge Dysplasie- und Kontrolltiere. Die Farbskala gibt das Signifikanzniveau der lokalen Volumenunterschiede wieder: rote Farbtöne = Volumenabnahme; blaue Farbtöne = Volumenzunahme (Erläuterungen unter 5.3.2.2, Seite 39)

5.3.2.3 Dysplasiebedingte Volumenzunahme im Zerebellum

Alte läionierte Tiere zeigten, analog zu den jungen Läsionstieren, eine deutlich verstärkte und beidseitige Volumenzunahme im Zerebellum (Abb. 21; Abb. 22 B: Reihe 3, Säule 1-7). Die bilaterale Hirnrindenatrophie manifestiert sich im Alter deutlich im sensomotorischen Kortex, in Arealen der Repräsentationen für die Vorder- und Hinterpfoten (Abb. 22 A: Reihe 4-7, Säule 1-7; Abb. 22 B: Reihe 2-4, Säule 1-7). Weitere Volumenabnahmen fanden sich bei alten dysplastischen Tieren in der Amygdala (Abb. 22 A: Reihe 5, Säule 2-7). Außerdem finden sich Volumenabnahmen im Hippokampus und Primär visuellen Kortex.

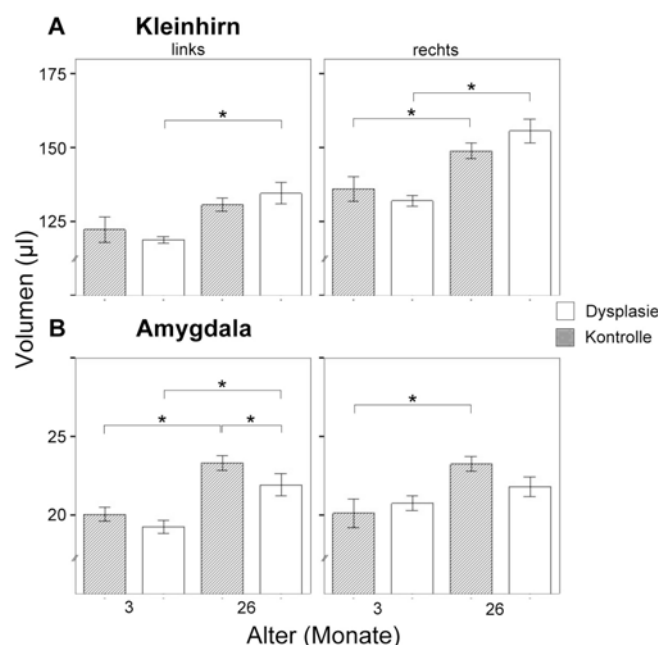


Abbildung 21: Volumenveränderungen in alten Dysplasietieren. Darstellung des quantitativen Gehirnvolumens in Mikrolitern. In alten Dysplasietieren ist eine bihemisphärische Volumenzunahme des Zerebellums zu verzeichnen. Ebenso konnte mit steigendem Lebensalter eine Volumenzunahme der Amygdala nachgewiesen werden. Der Mandelkern der linken Großhirnhemisphäre der alten Dysplasietiere war dabei jedoch signifikant kleiner, als die Amygdala der Kontrolltiere (* $p < 0,05$, Mittelwert \pm SEM, Student-TTEST).

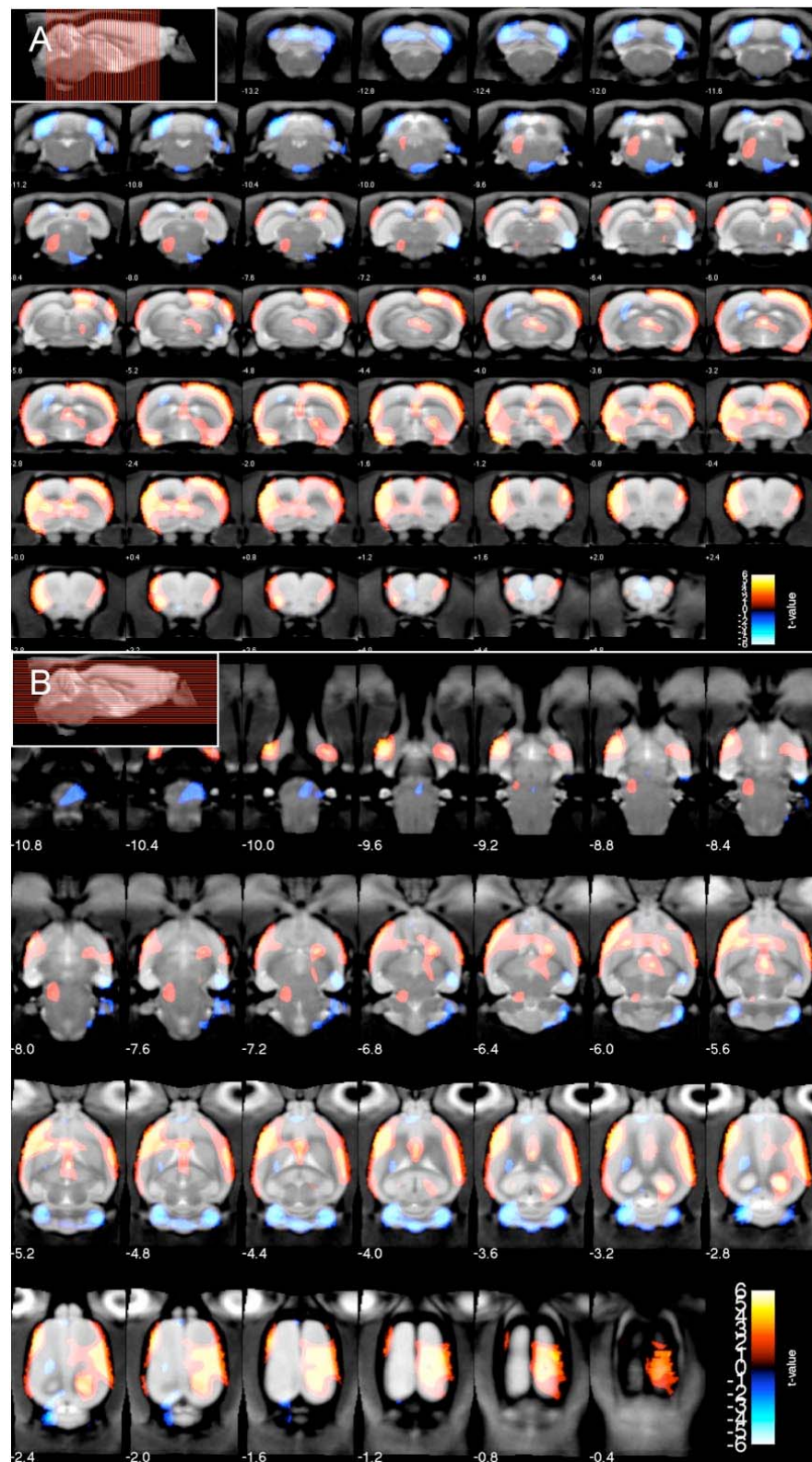


Abbildung 22: Dysplasie-bedingte Volumenveränderung alter Versuchstiere in (A) koronarer Schnittebene und in (B) axialer Schnittebene. Die Abbildung vergleicht alte Dysplasie- und Kontrolltiere. Der linken Bildhälfte entspricht die linke Körperhälfte. Die Farbskala gibt das Signifikanzniveau der lokalen Volumenunterschiede wieder: rote Farbtöne = Volumenabnahme; blaue Farbtöne = Volumenzunahme (Erläuterungen unter 5.3.2.3, Seite 41).

5.3.3 Vergleich der Verhaltens- und Volumenanalysen

Hier erfolgte ein Vergleich von Verhalten und Gehirnvolumen in Läsionstieren (Tab. 6). Es wurde jeweils ein junges und altes im Leitertest unter- bzw. überdurchschnittlich abschneidendes Läsionstier auf sein zerebrales Volumen hin untersucht. Hierbei zeigte sich eine tendenziell ausgebildete Asymmetrie des Scoreniveaus zugunsten der rechten Pfoten. Bemerkenswert ist, dass in alten dysplastischen Tieren ein schlechtes Scoreniveau der Pfoten mit einem großen Gesamtvolumen des Zerebrums und Zerebellums einhergeht und *vice versa*.

Tabelle 6: Zerebrale und zerebellare Asymmetrie und Verhaltensänderungen. Die Tabelle zeigt ein im Leitertest jeweils unter- und überdurchschnittlich abschneidendes junges (309, 311) und altes Versuchstier (29, 88) im Vergleich mit den dazugehörigen Volumina der Groß- und Kleinhirnhemisphären. Bemerkenswert ist die tendenzielle Volumenasymmetrie des Kleinhirns und des Großhirns zugunsten der rechten Seite, die in alten Versuchstieren mit progressivem Leistungsverlust zu einer deutlichen Volumendifferenz zwischen rechter und linker Gehirnhälfte führt. Vp li = linke Vorderpfote, Vp re = rechte Vorderpfote, Hp li = linke Hinterpfote, Hp re = rechte Hinterpfote, Hem (L) = linke Großhirnhemisphäre, Hem (R) = rechte Großhirnhemisphäre, C-Hem (L) = linke Kleinhirnhemisphäre, C-Hem (R) = rechte Kleinhirnhemisphäre; ¹ in Mikroliter

Tier	Vp li	Vp re	Hp li	Hp re	Hem (L)¹	Hem (R)¹	C-Hem (L)¹	C-Hem (R)¹
29	4,4	4,8	4,1	4,9	1450,7	1513,7	133,7	161,2
88	4,7	5,2	4,5	5,2	1414,8	1495,7	134,0	165,9
309	4,7	4,8	4,9	5,2	1268,3	1267,6	111,6	121,9
311	5,1	5,1	4,7	5,0	1265,2	1311,5	122,7	140,0

5.3.4 Immunhistochemische Untersuchungen

Um die neuroanatomische Grundlage der auf dem Prinzip der DBM basierenden Volumenveränderungen zu beleuchten, erfolgte die immunhistochemische Untersuchung der Gehirne nach reaktiven Astrozyten (GFAP) sowie der Synapsenfunktion (Synaptophysin) als Pilotversuch am Frontalgehirn. Die Bestimmung des Gehirnvolumens am histologisch aufgearbeiteten Gewebe erfolgte zur Verifizierung der MRT-Daten. Die Experimente ergaben in Kontrolltieren ein mit zunehmendem Alter größer werdendes Gehirnvolumen (Abb. 24, Tab. 7 des Anhangs). In jungen Läsionstieren zeigte sich rechtshemisphärisch eine Volumenabnahme. In alten Läsionstieren ließ sich eine bilaterale Gehirnatrophie nachweisen. Diese Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung stehen im Einklang mit den DBM-basierten volumetrischen Messungen. Alte Läsionstiere zeigten eine Zunahme der GFAP-Immunoreaktivität im Neokortex und Thalamus. Mit zunehmendem Lebensalter verringerte sich die Synaptophysin-Immunoreaktivität im Neokortex, Hippokampus und Thalamus, wohingegen alte dysplastische Tiere im Thalamus eine Zunahme der Synaptophysin-Anfärbbarkeit zeigten.

5.3.4.1 Immunhistochemische Validierung der DBM: Volumetrische Messungen am GFAP-gefärbten Gehirnschnitt

GFAP ist ein Intermediärfilamentprotein in Gliazellen oder in Zellen mit glialem Ursprung (Abb. 23). Von den immunhistochemisch aufgearbeiteten Gehirnschnitten kann problemlos die Fläche bestimmt werden (Fläche = analog zum Volumen). Zur Volumenbestimmung beider Hemisphären erfolgte eine Einteilung des frontalen Rattengehirns, bezogen auf Bregma, in fünf Abschnitte (Abb. 24): I = +4,68 mm bis +2,52 mm; II = +2,28 mm bis +0,24 mm; III = +0,12 mm bis -1,80 mm; IV = -1,92 mm bis -3,96 mm, V = -4,08 mm bis -6,00 mm.

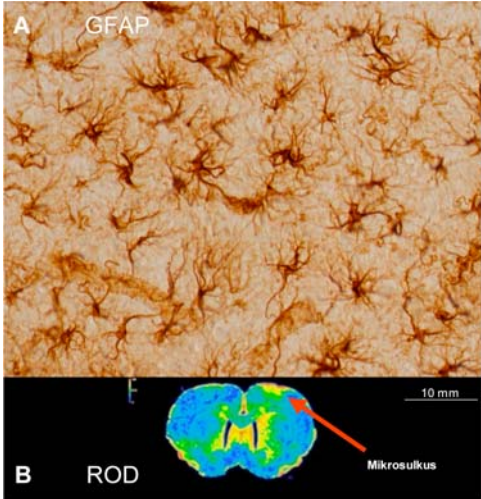


Abbildung 23: (A) Immunhistochemische Darstellung von Astrozyten durch Färbung von GFAP (40x Vergrößerung). (B) Aufnahme eines Gehirnschnittes in Falschfarben zur Bestimmung der ROD.

Alte Kontrolltiere zeigten gegenüber jungen Kontrolltieren eine Zunahme des Gehirnvolumens der linken (Abschnitte I bis IV) und rechten Gehirnhälfte (Abschnitte II bis IV). Bei jungen Versuchsratten ließ sich in der läsionierten Hemisphäre eine statistisch gesicherte Volumenabnahme in den Arealen IV und V nachweisen. Die alten dysplastischen Tiere zeigten bihemisphärisch eine signifikante Volumenabnahme der linken (Abschnitte II und III) und rechten Gehirnhälfte (Abschnitte III und IV).

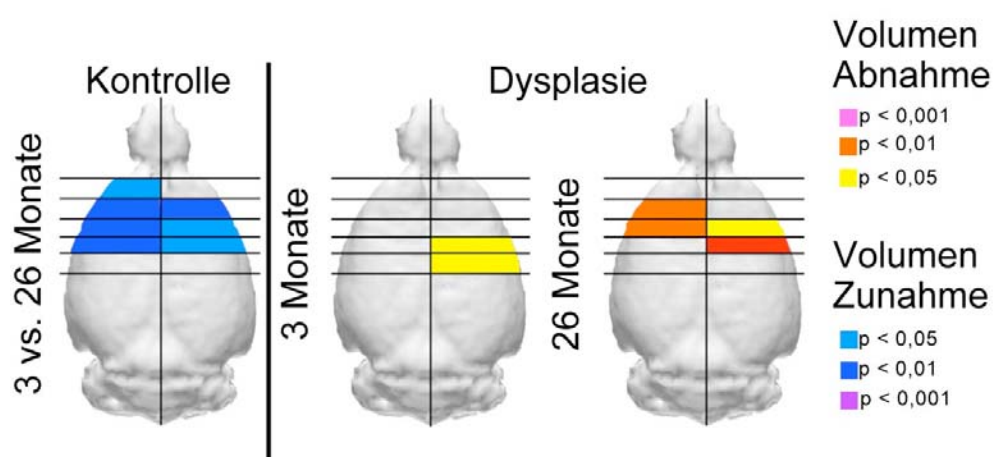


Abbildung 24: Volumetrie am immunhistochemisch gefärbten Schnitt (GFAP). **(A)** Die Abbildung illustriert ein mit zunehmendem Alter größer werdendes Gehirnvolumen in Kontrolltieren. **(B)** In jungen dysplastischen Tieren zeigte sich eine rechtshemisphärische Volumenabnahme. **(C)** In alten Läsionstieren ließ sich eine bilaterale Gehirnatrophie nachweisen.

5.3.4.2 Ausgeprägte Gliose in jungen dysplastischen Tieren

Die erhöhte Immunreaktivität von GFAP gibt Hinweis auf eine Gliose oder das Vorhandensein von aktivierten Astrozyten. Alte Kontrolltiere zeigten bilateral eine erhöhte ROD von GFAP im Neokortex sowie im Thalamus (Abb. 25: links/rechts: +13,08 % / +6,87 %; $p < 0,01$ / $p < 0,05$; Th: +114,74 % / +112,14 %; $p < 0,001$ / $p < 0,01$). Des Weiteren zeigten junge Läsionstiere bilateral eine signifikant verstärkte Anfärbbarkeit für GFAP im Neokortex und Thalamus (Abb. 25: +18,54 % / +18,88 %; $p < 0,001$ / $p < 0,001$). Die Gliose war bei jungen Läsionstieren deutlich stärker als bei alten Läsionstieren ausgeprägt (Abb. 25: +55,19 % / +45,78 %; $p < 0,001$ / $p < 0,01$; Abb. 24).

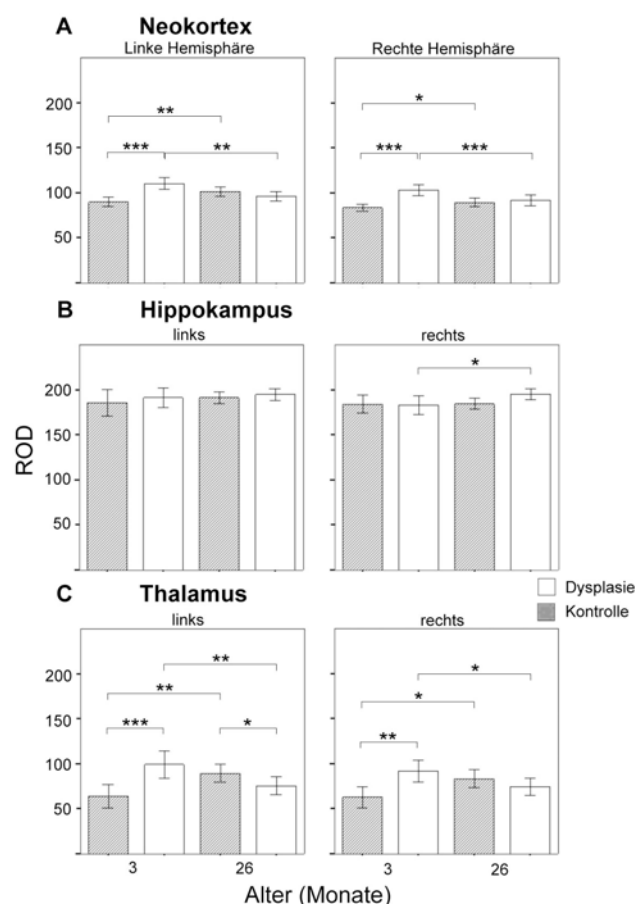


Abbildung 25: ROD für GFAP im Neokortex, Hippokampus und Thalamus. Während Kontrolltiere mit zunehmendem Alter einen Anstieg der GFAP-Immunoreaktivität im Neokortex zeigten (A), fand sich in läsierten Tieren ein gegenläufiger Befund. Ähnliche Befunde ließen sich im Thalamus nachweisen (C). Des Weiteren zeigen alte Läsionstiere eine Zunahme der GFAP-Anfärbbarkeit im rechten Hippokampus (B). (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; Mittelwert \pm SEM, Wilcoxon-Mann-Whitney-Test).

5.3.4.3 CD führt im Alter zu gesteigerter thalamischer Synaptophysinanfärbbarkeit

Synaptophysin ist ein integrales membranständiges Glykoprotein in den präsynaptischen Vesikeln von Neuronen und neuroendokrinen Zellen (Abb. 26). Die Menge gibt bedingt Aufschluss über die synaptische Aktivität. Die Immunreaktivität für Synaptophysin war im Kortex, Hippokampus und Thalamus junger Wistar-Ratten höher als in alten Versuchstieren. Im Thalamus von 26 Monate alten dysplastischen Ratten war die ROD im Vergleich zu gleichaltrigen Kontrolltieren bihemisphärisch signifikant höher (Abb. 27: links/rechts: +13,42 % / +14,50 %; $p < 0,05$ / $p < 0,05$).

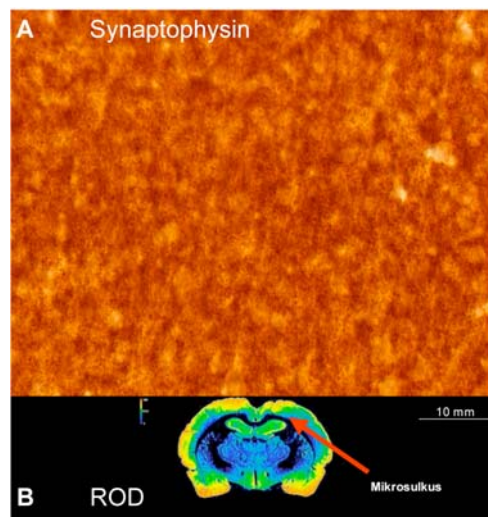


Abbildung 26: (A) Immunhistochemische Darstellung von Synaptophysin (40x Vergrößerung). (B) Aufnahme eines Gehirnschnittes in Falschfarben zur Bestimmung der ROD.

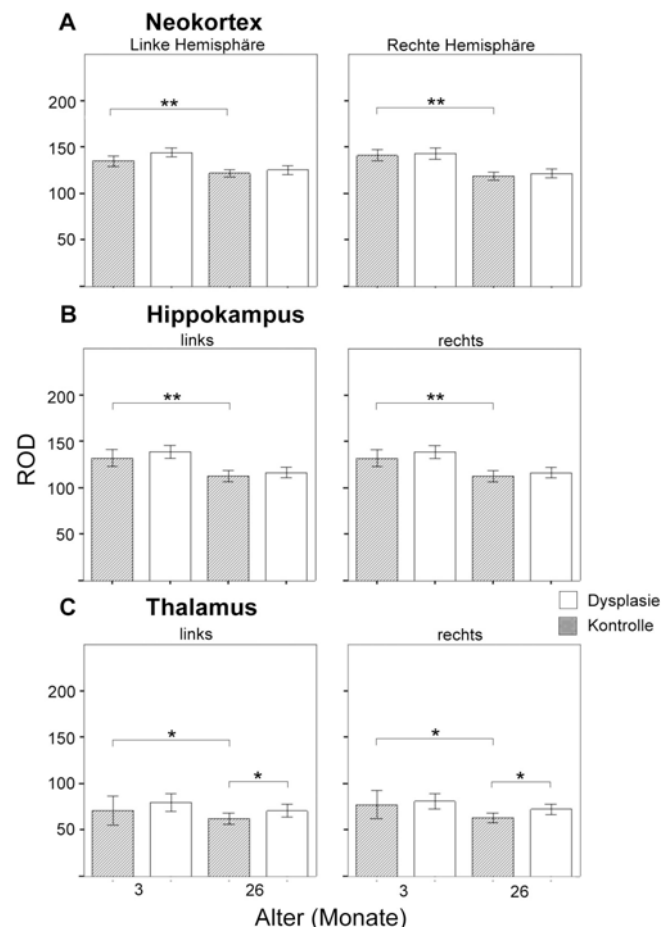


Abbildung 27: Bestimmung der ROD für SYN im Neokortex, Hippokampus und Thalamus. Alte Versuchstiere zeigten eine geringere Immunoreaktivität für SYN als junge (A, B). In alten Läsionstieren ließ sich bilateral eine erhöhte ROD des Thalamus nachweisen, als in gleichaltrigen Kontrolltieren (C). (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; Mittelwert \pm SEM, Wilcoxon-Mann-Whitney-Test).

6. DISKUSSION

6.1 Diskussion der Methoden

Induktion einer kortikalen Gefrierläsion und Ausbildung des Mikrosulkus

Die Induktion von Gefrierläsionen zum Zeitpunkt P0 erzeugte bei männlichen Wistar-Ratten nach der hier dargestellten Methode vergleichbare und reproduzierbare Dysplasien in Form eines dreischichtigen Mikrosulkus. Dieses Ergebnis ist übereinstimmend mit den Erfahrungen unserer eigenen Arbeitsgruppe und mit Berichten anderer Gruppen (Rosen et al. 1996, Redecker et al. 2000, Luhmann 2006, Jacobs et al. 1996, Dvorak et al. 1978, Dvorak und Feit 1977). Abwandlungen des Operationsprotokolls resultieren in Fehlbildungen des Kortex, welche der Schizenzephalie oder Polymikrogyrie ähneln und mitunter vierschichtig sind (Rosen und Galaburda 2000).

Die Gefrierläsionsoperation induziert Gefäßthrombosen und eine vollständige Nekrose der *Pia mater*. Die direkt unter der *Pia mater* liegenden Laminae I und IV (Laminae II und III sind noch nicht entwickelt) unterliegen ebenfalls einer totalen Nekrose (Abb. 1, Seite 4). Die Kortexschichten V und VIa unterliegen nur einer teilweisen Nekrose, da die Hirnkapillaren persistieren und es nur zum Untergang einzelner Neurone kommt. Die Lamina VIb bleibt vollständig erhalten, sie bildet die spätere Schicht IV der PMG. Zur Zone der totalen Nekrose migrieren Neuroblasten, die eigentlich für die Ausbildung der normalen Kortexschicht II (*Lamina granularis externa*) verantwortlich sind. Außerdem bilden diese Zellen mit ihren Dendriten Schicht I der PMG. Schicht III der PMG entsteht in der Zone der partiellen Nekrose durch die Kolonisierung mit Gliazellen und sie enthält auch vereinzelte Neurone des normalen, nicht dysplastischen Kortex. Aus dem ursprünglich sechsschichtigen Isokortex ist ein dysplastischer dreischichtiger Kortex entstanden (Zilles et al. 1998, Dvorak et al. 1978). Neue Untersuchungen berichten über Veränderungen der intrazellulären Chloridhomöostase und des

gabaergen Systems in der Ausbildung des Mikrosulkus durch direkte Alteration der neuronalen Migration (Shimizu-Okabe et al. 2007).

Bei der Verwendung eines Hypothermieprotokolls zur Narkotisierung der Versuchstiere ist es notwendig, scheinoperierte Tiere in den Versuchsgruppen mitzuführen, um Auswirkungen der Hypothermie auf die Hirnrindenstruktur und das Verhalten aufzudecken bzw. auszuschließen (Kolb und Cioe 2001). Nach den genannten Autoren kann allein die Kälteanästhesie eine kortikale Fehlbildung auslösen. In der vorliegenden Studie waren Unterschiede zwischen scheinoperierten und unbehandelten Kontrolltieren nicht auszumachen. Daher schließen wir einen Einfluss der Kryoanästhesie auf die hier vorgelegten Untersuchungen aus.

Verschiedene Gruppen berichteten über geschlechtsspezifische Unterschiede im Verhalten und der Hirnarchitektur nach Gefrierläsionsinduktion (Rosen et al. 1999, Herman et al. 1997). Aus diesem Grund und um zyklische Hormonschwankungen und deren Folgen zu vermeiden, wurden alle Versuche mit männlichen Versuchstieren durchgeführt. Die Alterseinteilung der Wistar-Ratten in junge (3 Monate), mittelalte (17 Monate) und alte (26 Monate) Versuchsgruppen erfolgte in Anlehnung an Burke et al. (Burke und Barnes 2006).

Bewertung lokomotorischer Fähigkeiten mit dem Leitertest

Der Leitertest ist dazu geeignet, subtile Beeinträchtigungen der Lokomotion und Koordination aufzudecken (Metz und Whishaw 2002). Aus diesem Grund war es uns möglich, Bewegungsdefizite der linken Vorder- und Hinterpfote bei Läsionstieren aufzudecken. Die Einführung der Parameter Schrittzahl, benutzte Sprossen und Laufzeit in die Auswertung brachte in diesem Experiment keinen zusätzlichen Informationsgewinn, da die Ergebnisse sehr heterogen ausfielen. Eine Bewertung der feinmotorischen Fähigkeiten der Vorderpfoten erfolgte nach dem „*front paw digit score*“ (Metz und Whishaw 2002). Die Überprüfung des pyramidalen Systems (Feinmotorik) ist mit dem Leitertest allerdings nur schwierig möglich, da aus der praktischen Erfahrung heraus die Zehenstellung bei Erreichen eines Pfotenscores von „6“ selten hinreichend gut zu beurteilen ist. Die

Feinmotorik der Vorderpfoten lässt sich mit dem aufwendigeren Greiftest und dessen exakterem Analyseverfahren besser beurteilen.

MRT-gestützte Volumetrie und Deformationsbasierte Morphometrie

Die DBM ist eine vollautomatisierte, reproduzierbare und sensitive Analysemethode für globale und lokale Strukturänderungen des Gehirns. Eine Übersicht zur Methodologie und Validierung der DBM wurde in humanen Studien von Prof. Gaser und anderen Arbeitsgruppen erbracht (Ashburner et al. 1998, Gaser et al. 2001, Gaser et al. 2004b, Gaser et al. 2004a, Gaser und Schlaug 2003, Gaser et al. 1999, Good et al. 2001a). Bis zu diesem Zeitpunkt liegt erst eine Veröffentlichung vor, welche die DBM am Tiermodell anwandte. In dieser Studie wurden longitudinale MRT-Messungen an einem Mausmodell für die Demenz vom Alzheimer-Typ mit einer Feldstärke von 9 Tesla durchgeführt und deformationsbasiert analysiert (Lau et al. 2008). Spezifische Untersuchungen am alternden Rattengehirn und zum Gefrierläsionsmodell liegen derzeit noch nicht vor.

Der größte Vorteil der DBM gegenüber dem Verfahren der voxelbasierten Morphometrie ist, dass die zu untersuchenden Hirnareale nicht *a priori* definiert und segmentiert sein müssen. Voxelbasierte Verfahren beruhen zum Großteil auf Grauwertdichteunterschieden zwischen grauer und weißer Substanz. Aus diesem Grund ist es wichtig, dass sämtliche MRT-Aufnahmen, die mit dieser Technik bearbeitet und verglichen werden sollen, mit dem gleichen Scanner und den gleichen Grundeinstellungen vorgenommen werden (Good et al. 2001b, Good et al. 2001c). Gleichzeitig sind die gewonnenen Ergebnisse an Regionen mit geringem Grauwertunterschied zwischen grauer und weißer Substanz, wie z.B. den Basalganglien, nicht so valide, wie an anderen Hirnarealen. Daher sind rein voxelbasierte Methoden lediglich für die Auswertung sehr kontrastreicher Regionen geeignet. Die vorliegende Studie nutzte für alle Aufnahmen den gleichen qualitätsgeprüften Scanner (3-Tesla-MRT, NORAS-Spulen, Institut für Diagnostische und Interventionelle Radiologie) und die gleichen Bildparameter. Es ist wichtig, sich immer zu vergegenwärtigen, dass ein Voxel den Durchschnitt der Grauwertdichte jeweils einer Region repräsentiert. Des Weiteren ist diese

morphologische Methode in großem Maße von der neuroanatomischen Varianz der untersuchten Regionen abhängig. So ist die voxelbasierte Teilanalyse für Veränderungen in Regionen mit einer hohen Variabilität recht unsensitiv, wohingegen sie für solche in Arealen mit geringer Variabilität eine höhere Sensitivität aufweist (Good et al. 2001b, Good et al. 2001c).

Die in dieser Arbeit vorgestellte quantitative, regionsspezifische Analyse von MRT-Datensätzen mit Berechnung der Volumina von Hirnarealen mit Hilfe des Ratten-Gehirn-Atlases nach Paxinos verdeutlicht die prinzipiellen Möglichkeiten des erarbeiteten Auswertungsalgorithmus. Dabei ist jedoch zu bedenken, dass interindividuelle Unterschiede zwischen Arealausdehnung und –größe bestehen und pathologische Entwicklungen zu einer umfangreichen Reorganisation des zerebralen Kortex führen. So demonstrierten einige Studien eine hohe plastische Kapazität der M1-Region der Ratte (Sanes et al. 1988, Sanes und Donoghue 2000, Sanes und Donoghue 1997). Es konnte gezeigt werden, dass nach Entfernung der Vibrissen der Barrel-Kortex Funktionen der benachbarten Vorderpfotenregion mit übernehmen kann und sich auf deren Gebiet mit ausbreitet (Sanes und Donoghue 1997). Es gilt daher zu beachten, dass sich die hier dargestellten absoluten Volumenveränderungen auf die von Paxinos definierten Areale beziehen.

Die DBM, aber auch jegliche andere MRT-Methodik kann keine Auskunft über mikrostrukturelle Details wie Zytoarchitektur und Gewebshistologie liefern. Deshalb wurde in dieser Arbeit die Immunhistochemie als zusätzliche morphologische Methode gewählt. Mit der Anfärbung neuronaler, glialer und synaptischer Marker war es möglich, die mit der DBM ermittelten morphologischen Veränderungen weiter zu klassifizieren.

Immunhistochemie und relative optische Dichte

Zur hochauflösenden Darstellung der Verteilung von Proteinen im Gehirnschnitt ist die immunhistochemische Markierung von Proteinen derzeit die beste Methode. Die Fixation mit Paraformaldehyd bedingt eine Veränderung der räumlichen Struktur und teilweise eine Maskierung bestimmter Antigene. Aus diesem Grund

wurde vor der immunhistochemischen Färbung von Synaptophysin eine Antigendemaskierung durch Erhitzung in Zitronensäure vorgenommen. Mittels Analyse der relativen optischen Dichte des DAB-Präzipitates lassen sich Unterschiede der Expressionsstärke im Gehirnschnitt analysieren (Fritschy und Mohler 1995, Fritschy et al. 1998).

6.2 Diskussion der Ergebnisse

Altersbedingte funktionelle Langzeitauswirkungen

Die vorliegenden Untersuchungen an unbehandelten Versuchstieren demonstrierten, dass sich die Vorder- und Hinterpfotenfunktion mit zunehmendem Alter gegensätzlich entwickeln. So ist der Vorderpfotenscore im Alter von 26 Monaten am höchsten, wohingegen der Hinterpfotenscore zu diesem Zeitpunkt am schlechtesten ist. Diese Ergebnisse sind in Einklang mit Berichten anderer Arbeitsgruppen (Spengler et al. 1995, Dinse 2005, Godde et al. 2002). Hier wird die Entwicklung des Schrittmusters sehr plausibel mit der vermehrten Benutzung der Vorderpfoten (z. B. für das Putzen und Fressen) und dem verminderten Gebrauch der Hinterpfoten in den Heimatkäfigen der Versuchstiere in Verbindung gebracht. In diesem Zusammenhang spricht man auch von einer „*use-dependent-plasticity*“ (Dinse 2005). Dieser Begriff meint, dass kleine Veränderungen in der täglichen Routine zu umfangreichen kortikalen Reorganisationsprozessen führen können. Mit elektrophysiologischen Untersuchungen zeigte die gleiche Arbeitsgruppe, dass eine altersbedingte Verschlechterung der Hinterpfotenfunktion mit einer Vergrößerung rezeptiver Felder (RF) von Neuronen der somatosensorischen kortikalen Hinterpfotenrepräsentation einhergeht. Diese RF zeichnen sich durch eine verstärkte Überlappung und weitgehende Aufhebung der topografischen Ordnung aus (Godde et al. 2002, Spengler et al. 1995). Die Untersuchung der RF der Vorderpfotenrepräsentation ergab keine Unterschiede zwischen jungen und alten Ratten (Godde et al. 2002).

Eine weitere wichtige Änderung des Verhaltens mit zunehmendem Alter betrifft das räumliche Wahrnehmungsvermögen, was eng an eine intakte hippokampale Funktion geknüpft ist. So ist bei Ratten gezeigt worden, dass Defizite im räumlichen Lernen mit einem Funktionsverlust des Hippokampus einhergehen (Rosenzweig und Barnes 2003). Ein Volumenverlust des Hippokampus geht beim Menschen mit Gedächtnislücken einher (Foster 2006).

Dysplasiebedingte funktionelle Langzeitauswirkungen

Mit der vorliegenden Studie wurde gezeigt, dass sich in jungen dysplastischen Versuchstieren keine funktionellen Auswirkungen im Leitertest aufdecken lassen. In der zur Dysplasie kontralateralen Vorder- und Hinterpfote etablierte sich mit zunehmendem Alter eine progrediente Verschlechterung der Pfotenfunktion. Da bei der ipsilateralen Vorderpfote keine altersbedingte Verbesserung wie bei den Kontrolltieren auftritt, scheint diese ebenfalls von der Dysplasie beeinträchtigt zu sein.

Die Beeinträchtigung der Lokomotion und Koordination ist höchstwahrscheinlich durch sensomotorische Schwächen bedingt. Massive Einschränkungen der Bewegungsfunktion und motorischer Fähigkeiten sind in diesem Modell prinzipiell nicht zu erwarten, da es sich lediglich um eine fokale Fehlbildung des Neokortex handelt. Im Gegensatz dazu steht die *Reeler*-Maus, die aufgrund einer umfangreichen Störung der Groß- und Kleinhirnentwicklung mit einem spiegelverkehrten Kortexaufbau offensichtliche Beeinträchtigungen, wie eine typische schwankende Gangart, Tremor und Ataxie aufweist (D'Arcangelo 2006, D'Arcangelo 2005). Daraus lässt sich der Schluss ziehen, dass fokale Fehlbildungen vor allem diskrete und latente Beeinträchtigungen nach sich ziehen, wohingegen globale Hirnstrukturveränderungen zu schweren funktionellen Einbußen führen.

Elektrophysiologische Studien des Gefrierläsionsmodells zeigten in der Vergangenheit, dass dieses Modell durch weit reichende Alterationen der Neurotransmittersysteme und der inhibitorischen Interneurone gekennzeichnet ist.

Das kortikale Gefrierläsionsmodell ist das erste Tiermodell überhaupt, in dem kortikale Übererregbarkeit nachgewiesen werden konnte (Jacobs et al. 1996). So wurde bewiesen, dass sich die epileptogene Zone (d.h. Ableitung einer epileptischen Aktivität nach Stimulation) nicht nur in der Läsionsregion selbst befindet, sondern auch in der PMG mit normaler Kortexschichtung rund um die kortikale Dysplasie herum lokalisiert ist (Jacobs et al. 1996, Jacobs et al. 1999b, Jacobs et al. 1999a, Luhmann et al. 1998b, Luhmann und Raabe 1996, Luhmann et al. 1998a, Hablitz und DeFazio 1998, Redecker et al. 2005, Redecker et al. 1998). Die Hyperexzitibilität des Mikrosulkus an sich und in der ihn umgebenden PMG wird durch ein Ungleichgewicht zwischen exzitatorischen (NMDA, AMPA, Kainat) und inhibitorischen (GABA) Erregungssystemen erklärt (Jacobs et al. 1999a). Zilles et al. zeigten durch Rezeptor-autoradiografische Studien, dass in der neokortikalen Dysplasie und der PMG die Bindung an GABA_A-Rezeptoren vermindert und an NMDA- und AMPA- Rezeptoren erhöht ist (Zilles et al. 1998). Unsere Arbeitsgruppe fand eine diffuse Herunterregulation bestimmter GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten im ipsilateralen Kortex (Redecker et al. 2000), wohingegen die Expression der glutamatergen Rezeptoren nicht beeinflusst schien (Hagemann et al. 2003). Neuere Untersuchungen an epileptogenen Mäusen implizieren außerdem einen generellen Einfluss des Adenosinsystems und vor allem der Adenosinkinase auf die Entstehung von Übererregbarkeit (Li et al. 2008). In-vitro-Studien legen des Weiteren eine Störung des gabaergen inhibitorischen Systems und der NMDA-abhängigen Hypererregung in der PMG nahe (Hablitz und DeFazio 1998, Luhmann et al. 1998b, Luhmann et al. 1998a). Mit dem Doppelpulsparadigma konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass die funktionelle Inhibition im ipsilateralen somatosensorischen Kortex zu der Läsion hin ungestört war (Hagemann et al. 2000a), wohingegen sich im kontralateralen somatosensorischen Kortex signifikante Störungen zeigten (Schmidt et al. 2006). Hinweise für eine gestörte synaptische Plastizität innerhalb der Umgebung der Dysplasie lieferten Peters et al. (Peters et al. 2004). Trotz dieser Befunde sind spontane epileptische Anfälle bei Ratten in-vivo an diesem Modell erst an einem einzigen Tier bei einer Narkoseeinleitung (Peters et al. 2004) und Hyperthermie-induziert nach dem Protokoll von Baram et al. beobachtet worden (Baram et al. 1997, Scantlebury et al. 2004). Rezidivierende Anfälle oder ein Status epilepticus, aber auch spontane epileptische Aktivität in-vitro sind in der Literatur nicht

beschrieben. Dies lässt sich als Hinweis auf eine Kompensation der Fehlverschaltung deuten.

Hinweise für weit reichende, einer Gefrierläsion folgende Reorganisationsprozesse lieferte die Arbeitsgruppe um Rosen und Mitarbeiter. Hier wurde gezeigt, dass die Dichte Parvalbumin-positiver Interneurone in den infragranulären Kortexschichten reduziert ist, was auf weit reichende Strukturveränderungen des Gehirns schließen lässt (Rosen et al. 1998). Unterstützung für diese Hypothese findet sich in Untersuchungen zur Innervationsstruktur der PMG. Diese erscheint in einer Färbung nach Nissl unauffällig, jedoch finden sich vielgestaltige Veränderungen. Untersuchungen zur Faserarchitektur ergaben, dass sich diese mit der Induktion einer Gefrierläsion diffus verändert. So finden sich kallosale Projektionsfasern in Schichten, die sonst gemieden werden (Giannetti et al. 1999). Die Gesamtanzahl angefärbter Neurone war in der PMG signifikant reduziert (Giannetti et al. 1999). Pathogenetisch werden in diesem Zusammenhang die hypoxisch-ischämische Verletzung im Rahmen der Gefrierläsion und glutamaterge Neurotoxizität verantwortlich gemacht. Die gleiche Arbeitsgruppe untersuchte an diesem Modell kortiko-kortikale Assoziationsfasern. Dabei fielen eine modifizierte Verbindung kortiko-kortikothalamischer Fasern, eine veränderte Verzweigungsstruktur in den Laminae II/III der PMG sowie ein Dornenverlust basaler Dendriten vor allem inhibitorischer Interneurone auf (Giannetti et al. 2000, Di Rocco et al. 2001). In Lamina V der PMG fielen Neurone mit längeren Basaldendriten auf (Di Rocco et al. 2001, Di Rocco et al. 2002). Diese Befunde sprechen für eine Störung der inhibitorischen Interneurone.

Die Defizite der Läsionstiere im Leitertest könnten durch die unterschiedlichsten Mechanismen entstanden sein. Eine wichtige Rolle spielt der trauma-induzierte Neuronenverlust durch die Gefrierläsion. Dieser wird von jungen Tieren noch gut kompensiert, wie es auch Pullela et al. berichten (Pullela et al. 2006). Diese Arbeit beschreibt einen im Tiermodell oftmals fehlenden funktionellen Effekt einer traumatischen Hirnschädigung innerhalb des Sensomotorischen Kortex in jungen Versuchstieren (Pullela et al. 2006). Zusätzlich kommen bei den Läsionstieren noch die umfangreichen Veränderungen der verschiedenen

Neurotransmittersysteme und eine Störung der interhemisphärischen Inhibition hinzu. Die gestörte Kommunikation zwischen den beiden Hemisphären scheint grundlegend die Defizite im Leiterrast zu bedingen.

Unterstützung dieser Hypothese findet sich in den pathophysiologischen Erklärungsversuchen der Schizophrenie, die von einem multifaktoriellen Entstehungsprozess ausgehen (Lewis et al. 2005, Freedman 2003). Eine Schlüsselrolle wird hier der Alteration verschiedener Neurotransmittersysteme und der inhibitorischen Interneurone zugeschrieben. So kommt es bei Schizophrenieerkrankten zu einer Herunterregulation des gabaergen Systems, einer verminderten Neuronenmigration während der Hirnrindenentwicklung und zu einem Verlust an Neuropil (Freedman 2003). Außerdem findet sich eine reduzierte Dichte an Parvalbumin-positiven Interneuronen (Lewis et al. 2005). In bestimmten Hirnregionen kommt es zusätzlich zu einem Verlust an Neuronen (Freedman 2003). Die vielfältige Symptomatik kortikaler Dysplasien und der Schizophrenie ist dahingehend miteinander vergleichbar, dass sie bei beiden Krankheitsbildern jeweils von der Lokalisation pathologischer Veränderungen abhängig ist. Das klinische Erscheinungsbild lässt sich durch die Alteration spezifischer kortikaler inhibitorischer Regelkreise erklären (Lewis et al. 2005).

Patienten mit zerebraler Ischämie und motorischen Defiziten lieferten in einer fMRT-Studie einen weiteren möglichen Erklärungsansatz für die motorischen Beeinträchtigungen der Läsionstiere. Hier zeigte sich eine pathologische, interhemisphärische Interaktion zwischen den ipsi- und kontralateralen Schlüsselarealen für die Bewegungsinitiierung. Die kontralaterale, gesunde Hemisphäre hemmte verstärkt die ipsilaterale Hemisphäre und führte zu einer Einschränkung der Greiffunktion mit der betroffenen Hand (Grefkes et al. 2008). Einer fehlenden Hemmung der ipsilateralen zur kontralateralen Hirnhälfte mit einer resultierenden Enthemmung der gesunden Hemisphäre könnte eine Schlüsselrolle im pathogenetischen Prozess zugeschrieben werden. Dies wird von Ergebnissen unserer eigenen Arbeitsgruppe gestützt, die von einer Disinhibition der kontralateralen Hemisphäre bei fokalen Hirnläsionen berichtet (Schmidt et al. 2006).

Volumenalterationen des jungen und alten Rattengehirns

Die vorgelegten Ergebnisse der volumetrischen MRT-Messungen demonstrieren in alten Kontrolltieren einen Volumenverlust im visuellen und fronto-parietalen Kortex sowie eine Volumenzunahme im piriformen und auditorischen Kortex und den Basalganglien. Die Befunde sind teilweise durch eine ausgeprägte Asymmetrie charakterisiert.

Eine histomorphologische Studie an Ratten konnte ebenfalls volumetrische Asymmetrien darstellen (Zilles et al. 1996). Die interhemisphärischen Volumenunterschiede wurden hier in Lamina IV der *Area striata* nachgewiesen und mit einer höheren Dichte an myelinisierten Fasern in Verbindung gebracht. Für die Neurotransmitter des glutamatergen und gabaergen Systems konnten keine Differenzen nachgewiesen werden (Zilles et al. 1996). Eine weitere Arbeit konnte an Ratten ein höheres Neuropil-Volumen und damit eine geringere Zelldichte im rechtshemisphärischen Motorkortex bei experimentell induziertem präferentielltem Gebrauch der linken Vorderpfote nachweisen (Diaz et al. 1994). Dies stellt einen Hinweis für eine eventuelle Volumenzunahme der kortikalen Repräsentation bei vermehrter Nutzung dar.

Das visuelle System der Ratte ist durch einen progressiven Funktionsverlust mit zunehmendem Alter charakterisiert. In einer Arbeit von Wang et al. ist mit Hilfe von extrazellulären Einzelzelleableitungen an Neuronen des visuellen Kortex eine funktionelle Degradation in alten Ratten nachgewiesen worden (Wang et al. 2006). Dabei war die Anzahl der Neurone über die gesamte Lebensspanne der Tiere stabil, wohingegen die Synapsendichte und die Gesamtanzahl myelinisierter Fasern reduziert war (Wang et al. 2006). Nach mündlicher Auskunft von Frau Prof. Sigrid Löwel (Professur für Neurobiologie, Institut für Zoologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena) nimmt mit zunehmendem Alter der Visus von Ratten kontinuierlich ab. Diese Befunde sprechen dafür, dass eine verminderte Nutzung zu einer Volumenabnahme der kortikalen Repräsentation führen könnte.

Die beschriebenen volumetrischen Asymmetrien könnte man mit Hilfe des Konzeptes der „*use-dependent-plasticity*“ interpretieren und mit kortikalen Reorganisationsprozessen erklären (Dinse 2006, Dinse 2005). Damit ist gemeint,

dass das Hirn- bzw. Hirnteilvolumen an die gegenwärtige Funktion des entsprechenden Areals und die Ausprägung der Lateralisierung von Hirnfunktionen geknüpft sein könnte. So wäre es möglich, dass ein progressiver Visusverlust der alten Ratte mit Volumenabnahmen des visuellen Kortex in Zusammenhang steht. Auf der anderen Seite könnte ein präferentieller Gebrauch einer Vorderpfote (im Sinne einer Händigkeit) eine Volumenzunahme des entsprechenden motorischen Areals des sensomotorischen Kortex bedingen. Unterstützung findet dieser Ansatz auch bei einer MRT-volumetrischen Longitudinalstudie von Draganski et al., bei der in neu-jonglierenden Probanden Volumenzunahmen innerhalb von Hirnarealen, die für komplexe visuell-motorische Leistungen nötig sind, gemessen werden konnten (Draganski et al. 2004). Die Kernaussage dieser Arbeit ist, dass anatomische Änderungen für die zerebrale Plastizität wichtiger sind als funktionelle Anpassungen (Draganski et al. 2004).

Die Induktion einer Gefrierläsion erzeugte in drei Monate alten Läsionstieren eine bilaterale Volumenabnahme des sensomotorischen Kortex und der Hippokampusformation. Die Volumenabnahme ist rechtsbetont und interhemisphärisch korrespondierend. Innerhalb der komplementären zerebellaren Hemisphäre zeigt sich eine Volumenzunahme. In alten Läsionstieren bewirkt die Dysplasie eine deutliche bilaterale Hirnatrophie und einen bihemisphärischen Volumenzuwachs des Zerebellums. Die Volumenverluste sind als Ausdruck des traumainduzierten Substanzverlustes mit anhaltendem Neuronenverlust und entzündlicher Reaktion im jungen Alter und als Spätfolge der frühen postnatalen Hirnschädigung interpretierbar (Siren et al. 2006, Püllela et al. 2006). Damit stellt eine endogene Hirnfehlbildung einen Risikofaktor für Neurodegeneration dar. Für exogene Hirnfehlbildungen ist dieses Wissen bereits bekannt (Siren et al. 2006).

Eine besondere Beachtung in dieser Arbeit erlangt die Rolle der zerebellaren Kompensation, ausgedrückt als bihemisphärische Volumenzunahme des Zerebellums von Läsionstieren. Bemerkenswert ist der Umstand, dass die Volumenveränderungen bei drei Monate alten Tieren linksbetont auftreten, wohingegen sie in 26 Monate alten Tieren beide Kleinhirnhälften betrifft. Über die morphologische Grundlage der Volumenveränderung kann an dieser Stelle lediglich spekuliert werden, da dazu in dieser Arbeit keine expliziten

Untersuchungen durchgeführt worden sind. In Frage kommen alle Grundkomponenten der Plastizität – Neurone, Gliazellen, Synapsen und Gefäße (Markham und Greenough 2004). Das Kleinhirn stellt das Paradebeispiel der plastischen Eigenschaften des zentralen Nervensystems dar. Anfang der neunziger Jahre wurde demonstriert, dass Lernen die Synaptogenese und motorische Aktivität die Angiogenese im Kleinhirn fördert (Black et al. 1990). Ob jedoch eine erhöhte Anzahl an Synapsen messbare Volumeneffekte hervorrufen kann, ist fraglich. Volumeneffekte lassen sich weiterhin durch metabolische Phänomene erklären. Eine verstärkte Aktivität zerebellarer Neurone könnte einen höheren Stoffwechselumsatz von Gliazellen mit der Folge einer Zellschwellung nach sich ziehen, oder aber aufgrund einer Anhäufung von Stoffwechselmetaboliten eine vermehrte Durchblutung zur Folge haben. Diese beiden letztgenannten Mechanismen wären demzufolge indirekte Mechanismen für die Verursachung von Volumenveränderungen.

Wie aus den Resultaten der Verhaltensuntersuchungen in Zusammenschau mit den volumetrischen Messungen ersichtlich ist, scheint die zerebellare Anpassung als Antwort auf eine kortikale Gefrierläsion nicht allein für die kompensatorischen Mechanismen im jungen Alter verantwortlich zu sein. Eine wichtige Rolle für den Ausgleich einer kortikalen Schädigung könnte auch das *Corpus callosum* spielen. Eine aktuelle Übersichtsarbeit zeigte, dass die Entitäten der CD Polymikrogyrie, Pachygyrie oder Heterotopie die Entwicklung eines hypoplastischen Balkens fördern können (Paul et al. 2007). Dessen Bedeutung könnte mit zunehmendem Alter eine größere Rolle spielen und für die fehlende Kompensation in alten läsierten Versuchstieren verantwortlich sein.

Veränderungen in der immunhistochemischen Distribution von GFAP und Synaptophysin

Eine Volumenbestimmung an den mit GFAP immunhistochemisch gefärbten Hirnschnitten bestätigte die DBM-Volumenberechnungen. Die histologischen Volumenveränderungen konnten für junge Versuchstiere schon durch Rosen et al. bestätigt werden (Rosen et al. 1994, Rosen et al. 1996, Rosen et al. 1995). Diese Arbeitsgruppe zeigte ebenfalls eine Hirnatrophie in jungen Tieren (Rosen et al.

1995, Rosen et al. 1996, Rosen et al. 1994). Die ROD für GFAP war in Läsionstieren generell höher, als in Kontrolltieren. Diese Befunde sind konsistent mit dem Vorhandensein von reaktiven Astrozyten und sprechen für eine anhaltende Pathogenese der Gefrierläsion (Pullela et al. 2006).

Alte Läsionstiere zeigten im Vergleich zu gleichaltrigen Kontrollen beidseitig eine verstärkte ROD für SYP im gesamten Thalamus. Dieser Effekt ließ sich nur in alten Tieren nachweisen und kann als Ausdruck einer erhöhten Aktivierung in einem Regelkreis zur Steuerung der Motorik (Kleinhirn -> Thalamus -> Motorischer Kortex) durch zerebellothalamische Fasern angesehen werden. Eine erhöhte Anfärbbarkeit für SYP kann aber auch einer diffusen neuronalen Fehlverschaltung zugeschrieben werden (Shojo und Kibayashi 2006).

7. SCHLUSSFOLGERUNGEN

Wie unsere Experimente zeigen konnten, führt eine fokale Hirnrindenentwicklungsstörung zu weit reichenden Veränderungen des Gehirns, welche Ähnlichkeiten mit neurodegenerativen Erkrankungen aufweisen. Unsere Befunde demonstrierten, dass eine kortikale Dysplasie einen progressiven Einfluss in alten Versuchstieren hat und mit einem Verlust an kortikaler Substanz und funktionellen Fähigkeiten einhergeht. Die Funktion war in jungen Tieren nicht beeinträchtigt. Bemerkenswert ist, dass durch die Testung der Koordination und Lokomotion mit dem Leitertest auch eine Beeinträchtigung der kontralateralen Vorderpfote mit zunehmendem Alter nachgewiesen werden konnte. In diesem Sinne sind auch die Ergebnisse der volumetrischen MRT-Messungen zu werten, die vor allem in alten Tieren eine bilaterale Hirnrindenatrophie und eine Volumenzunahme in korrespondierenden Kleinhirnarealen aufdecken konnten. Dabei wurde besonders das methodische Potential der DBM für die Analyse nicht-humaner, kernspintomografischer Aufnahmen deutlich. Durch DBM sind globale, regionale und longitudinale Analysen von Strukturveränderungen möglich, ohne ROIs definieren und segmentieren zu müssen. Wie unsere Befunde nahe legen, scheint eine fokale kortikale Dysplasie innerhalb des sensomotorischen Kortex in komplexe motorische Regelkreise einzugreifen. Eine Kompensation der Hirnrindenentwicklungsstörung scheint dabei mutmaßlich über einen Regelkreis zwischen sensomotorischen Kortex und Zerebellum unter Vermittlung zerebellothalamischer Bahnen und motorischer Projektionskerne des Thalamus ausgebildet zu werden. Über den Gegenstand fehlender funktioneller Defizite in Jungtieren oder insuffizienter Kompensation in alten Tieren kann an dieser Stelle keine Aussage getroffen werden. Die vorgelegten Daten deuten auf eine anhaltende Pathogenese der kortikalen Dysplasie hin. Dieser Umstand bedarf jedoch weiterer Untersuchungen. Unklar bleibt an dieser Stelle des Weiteren, welche Rolle die zerebellare Kompensation in Erkrankungen mit fokalem neurologischem Defizit spielt und ob sich daraus ein neues Verständnis für funktionelle Beeinträchtigungen oder therapeutische Ansätze ableiten lässt. Weiterer Forschungsbedarf besteht außerdem dahingehend, welche neuroanatomischen Veränderungen den mit der DBM messbaren Volumenalterationen zugrunde liegen.

8. LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS

- Alonso-Nanclares L, Garbelli R, Sola RG, Pastor J, Tassi L, Spreafico R, DeFelipe J. 2005. Microanatomy of the dysplastic neocortex from epileptic patients. *Brain*, 128 (Pt 1):158-173.
- Ashburner J. 2004. *Human Brain Function*. 2. Aufl. Amsterdam. Elsevier.
- Ashburner J, Friston KJ. 2000. Voxel-based morphometry--the methods. *Neuroimage*, 11 (6 Pt 1):805-821.
- Ashburner J, Hutton C, Frackowiak R, Johnsrude I, Price C, Friston K. 1998. Identifying global anatomical differences: deformation-based morphometry. *Hum Brain Mapp*, 6 (5-6):348-357.
- Baram TZ, Gerth A, Schultz L. 1997. Febrile seizures: an appropriate-aged model suitable for long-term studies. *Brain Res Dev Brain Res*, 98 (2):265-270.
- Bast T, Ramantani G, Seitz A, Rating D. 2006. Focal cortical dysplasia: prevalence, clinical presentation and epilepsy in children and adults. *Acta Neurol Scand*, 113 (2):72-81.
- Black JE, Isaacs KR, Anderson BJ, Alcantara AA, Greenough WT. 1990. Learning causes synaptogenesis, whereas motor activity causes angiogenesis, in cerebellar cortex of adult rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87 (14):5568-5572.
- Burke SN, Barnes CA. 2006. Neural plasticity in the ageing brain. *Nat Rev Neurosci*, 7 (1):30-40.
- D'Arcangelo G. 2005. The reeler mouse: anatomy of a mutant. *Int Rev Neurobiol*, 71:383-417.
- D'Arcangelo G. 2006. Reelin mouse mutants as models of cortical development disorders. *Epilepsy Behav*, 8 (1):81-90.
- Di Rocco F, Giannetti S, Gaglioli P, Di Rocco C, Granato A. 2001. Dendritic anomalies in a freezing model of microgyria: a parametric study. *Pediatr Neurosurg*, 34 (2):57-62.
- Di Rocco F, Giannetti S, Gaglioli P, Di Rocco C, Granato A. 2002. Dendritic architecture of corticothalamic neurons in a rat model of microgyria. *Childs Nerv Syst*, 18 (12):690-693.
- Diaz E, Pinto-Hamuy T, Fernandez V. 1994. Interhemispheric structural asymmetry induced by a lateralized reaching task in the rat motor cortex. *Eur J Neurosci*, 6 (7):1235-1238.
- Dinse HR. 2005. Treating the aging brain: cortical reorganization and behavior. *Acta Neurochir Suppl*, 93:79-84.
- Dinse HR. 2006. Cortical reorganization in the aging brain. *Prog Brain Res*, 157:57-80.
- Draganski B, Gaser C, Busch V, Schuierer G, Bogdahn U, May A. 2004. Neuroplasticity: changes in grey matter induced by training. *Nature*, 427 (6972):311-312.
- Dvorak K, Feit J. 1977. Migration of neuroblasts through partial necrosis of the cerebral cortex in newborn rats-contribution to the problems of morphological development and developmental period of cerebral microgyria. Histological and autoradiographical study. *Acta Neuropathol (Berl)*, 38 (3):203-212.
- Dvorak K, Feit J, Jurankova Z. 1978. Experimentally induced focal microgyria and status verrucosus deformis in rats--pathogenesis and interrelation.

- Histological and autoradiographical study. *Acta Neuropathol (Berl)*, 44 (2):121-129.
- Fitch RH, Tallal P, Brown CP, Galaburda AM, Rosen GD. 1994. Induced microgyria and auditory temporal processing in rats: a model for language impairment? *Cereb Cortex*, 4 (3):260-270.
- Foster TC. 2006. Biological markers of age-related memory deficits: treatment of senescent physiology. *CNS Drugs*, 20 (2):153-166.
- Freedman R. 2003. Schizophrenia. *N Engl J Med*, 349 (18):1738-1749.
- Fritschy JM, Mohler H. 1995. GABAA-receptor heterogeneity in the adult rat brain: differential regional and cellular distribution of seven major subunits. *J Comp Neurol*, 359 (1):154-194.
- Fritschy JM, Weinmann O, Wenzel A, Benke D. 1998. Synapse-specific localization of NMDA and GABA(A) receptor subunits revealed by antigen-retrieval immunohistochemistry. *J Comp Neurol*, 390 (2):194-210.
- Gaser C. 2001. Deformationsbasierte Morphometrie - eine Methode zur Analyse hirnstruktureller Veränderungen. Dissertation. Magdeburg.
- Gaser C, Schlaug G. 2003. Brain structures differ between musicians and non-musicians. *J Neurosci*, 23 (27):9240-9245.
- Gaser C, Volz HP, Kiebel S, Riehemann S, Sauer H. 1999. Detecting structural changes in whole brain based on nonlinear deformations-application to schizophrenia research. *Neuroimage*, 10 (2):107-113.
- Gaser C, Nenadic I, Buchsbaum BR, Hazlett EA, Buchsbaum MS. 2001. Deformation-based morphometry and its relation to conventional volumetry of brain lateral ventricles in MRI. *Neuroimage*, 13 (6 Pt 1):1140-1145.
- Gaser C, Nenadic I, Volz HP, Buchel C, Sauer H. 2004a. Neuroanatomy of "hearing voices": a frontotemporal brain structural abnormality associated with auditory hallucinations in schizophrenia. *Cereb Cortex*, 14 (1):91-96.
- Gaser C, Nenadic I, Buchsbaum BR, Hazlett EA, Buchsbaum MS. 2004b. Ventricular enlargement in schizophrenia related to volume reduction of the thalamus, striatum, and superior temporal cortex. *Am J Psychiatry*, 161 (1):154-156.
- Giannetti S, Gaglini P, Granato A, Di Rocco C. 1999. Organization of callosal connections in rats with experimentally induced microgyria. *Childs Nerv Syst*, 15 (9):444-448; discussion 449-450.
- Giannetti S, Gaglini P, Di Rocco F, Di Rocco C, Granato A. 2000. Organization of cortico-cortical associative projections in a rat model of microgyria. *Neuroreport*, 11 (10):2185-2189.
- Godde B, Berkefeld T, David-Jurgens M, Dinse HR. 2002. Age-related changes in primary somatosensory cortex of rats: evidence for parallel degenerative and plastic-adaptive processes. *Neurosci Biobehav Rev*, 26 (7):743-752.
- Good CD, Ashburner J, Frackowiak RS. 2001a. Computational neuroanatomy: new perspectives for neuroradiology. *Rev Neurol (Paris)*, 157 (8-9 Pt 1):797-806.
- Good CD, Johnsrude IS, Ashburner J, Henson RN, Friston KJ, Frackowiak RS. 2001b. A voxel-based morphometric study of ageing in 465 normal adult human brains. *Neuroimage*, 14 (1 Pt 1):21-36.
- Good CD, Johnsrude I, Ashburner J, Henson RN, Friston KJ, Frackowiak RS. 2001c. Cerebral asymmetry and the effects of sex and handedness on brain structure: a voxel-based morphometric analysis of 465 normal adult human brains. *Neuroimage*, 14 (3):685-700.

- Grefkes C, Nowak DA, Eickhoff SB, Dafotakis M, Kust J, Karbe H, Fink GR. 2008. Cortical connectivity after subcortical stroke assessed with functional magnetic resonance imaging. *Ann Neurol*, 63 (2):236-246.
- Hablitz JJ, DeFazio T. 1998. Excitability changes in freeze-induced neocortical microgyria. *Epilepsy Res*, 32 (1-2):75-82.
- Hagemann G, Redecker C, Witte OW. 2000a. Intact functional inhibition in the surround of experimentally induced focal cortical dysplasias in rats. *J Neurophysiol*, 84 (1):600-603.
- Hagemann G, Redecker C, Witte OW. 2000b. [Cortical dysgenesis: current classification, MRI diagnosis, and clinical review]. *Nervenarzt*, 71 (8):616-628.
- Hagemann G, Kluska MM, Redecker C, Luhmann HJ, Witte OW. 2003. Distribution of glutamate receptor subunits in experimentally induced cortical malformations. *Neuroscience*, 117 (4):991-1002.
- Herman AE, Galaburda AM, Fitch RH, Carter AR, Rosen GD. 1997. Cerebral microgyria, thalamic cell size and auditory temporal processing in male and female rats. *Cereb Cortex*, 7 (5):453-464.
- Jacobs KM, Gutnick MJ, Prince DA. 1996. Hyperexcitability in a model of cortical maldevelopment. *Cereb Cortex*, 6 (3):514-523.
- Jacobs KM, Kharazia VN, Prince DA. 1999a. Mechanisms underlying epileptogenesis in cortical malformations. *Epilepsy Res*, 36 (2-3):165-188.
- Jacobs KM, Hwang BJ, Prince DA. 1999b. Focal epileptogenesis in a rat model of polymicrogyria. *J Neurophysiol*, 81 (1):159-173.
- Kolb B, Cioe J. 2001. Cryoanesthesia on postnatal day 1, but not day 10, affects adult behavior and cortical morphology in rats. *Brain Res Dev Brain Res*, 130 (1):9-14.
- Lau JC, Lerch JP, Sled JG, Henkelman RM, Evans AC, Bedell BJ. 2008. Longitudinal neuroanatomical changes determined by deformation-based morphometry in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroimage*, 42 (1):19-27.
- Lewis DA, Hashimoto T, Volk DW. 2005. Cortical inhibitory neurons and schizophrenia. *Nat Rev Neurosci*, 6 (4):312-324.
- Li T, Ren G, Lusardi T, Wilz A, Lan JQ, Iwasato T, Itohara S, Simon RP, Boison D. 2008. Adenosine kinase is a target for the prediction and prevention of epileptogenesis in mice. *J Clin Invest*, 118 (2):571-582.
- Luhmann HJ. 2006. The cortical freeze lesion model. Amsterdam: Elsevier.
- Luhmann HJ, Raabe K. 1996. Characterization of neuronal migration disorders in neocortical structures: I. Expression of epileptiform activity in an animal model. *Epilepsy Res*, 26 (1):67-74.
- Luhmann HJ, Huston JP, Hasenohrl RU. 2005. Contralateral increase in thigmotactic scanning following unilateral barrel-cortex lesion in mice. *Behav Brain Res*, 157 (1):39-43.
- Luhmann HJ, Raabe K, Qu M, Zilles K. 1998a. Characterization of neuronal migration disorders in neocortical structures: extracellular in vitro recordings. *Eur J Neurosci*, 10 (10):3085-3094.
- Luhmann HJ, Karpuk N, Qu M, Zilles K. 1998b. Characterization of neuronal migration disorders in neocortical structures. II. Intracellular in vitro recordings. *J Neurophysiol*, 80 (1):92-102.
- Markham JA, Greenough WT. 2004. Experience-driven brain plasticity: beyond the synapse. *Neuron Glia Biol*, 1 (4):351-363.

- Metz GA, Whishaw IQ. 2002. Cortical and subcortical lesions impair skilled walking in the ladder rung walking test: a new task to evaluate fore- and hindlimb stepping, placing, and co-ordination. *J Neurosci Methods*, 115 (2):169-179.
- Paul LK, Brown WS, Adolphs R, Tyszka JM, Richards LJ, Mukherjee P, Sherr EH. 2007. Agenesis of the corpus callosum: genetic, developmental and functional aspects of connectivity. *Nat Rev Neurosci*, 8 (4):287-299.
- Paxinos G, Watson C. 2005. The rat brain in stereotaxic coordinates. 5. Aufl. Amsterdam. Elsevier.
- Peters O, Redecker C, Hagemann G, Bruehl C, Luhmann HJ, Witte OW. 2004. Impaired synaptic plasticity in the surround of perinatally acquired [correction of aquired] dysplasia in rat cerebral cortex. *Cereb Cortex*, 14 (10):1081-1087.
- Pullela R, Raber J, Pfankuch T, Ferriero DM, Claus CP, Koh SE, Yamauchi T, Rola R, Fike JR, Noble-Haeusslein LJ. 2006. Traumatic injury to the immature brain results in progressive neuronal loss, hyperactivity and delayed cognitive impairments. *Dev Neurosci*, 28 (4-5):396-409.
- Redecker C, Luhmann HJ, Hagemann G, Fritschy JM, Witte OW. 2000. Differential downregulation of GABAA receptor subunits in widespread brain regions in the freeze-lesion model of focal cortical malformations. *J Neurosci*, 20 (13):5045-5053.
- Redecker C, Hagemann G, Witte OW, Marret S, Evrard P, Gressens P. 1998. Long-term evolution of excitotoxic cortical dysgenesis induced in the developing rat brain. *Brain Res Dev Brain Res*, 109 (1):109-113.
- Redecker C, Hagemann G, Kohling R, Straub H, Witte OW, Speckmann EJ. 2005. Optical imaging of epileptiform activity in experimentally induced cortical malformations. *Exp Neurol*, 192 (2):288-298.
- Rosano C, Aizenstein HJ, Studenski S, Newman AB. 2007. A regions-of-interest volumetric analysis of mobility limitations in community-dwelling older adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 62 (9):1048-1055.
- Rosen GD, Galaburda AM. 2000. Single cause, polymorphic neuronal migration disorders: an animal model. *Dev Med Child Neurol*, 42 (10):652-662.
- Rosen GD, Sherman GF, Galaburda AM. 1994. Radial glia in the neocortex of adult rats: effects of neonatal brain injury. *Brain Res Dev Brain Res*, 82 (1-2):127-135.
- Rosen GD, Sherman GF, Galaburda AM. 1996. Birthdates of neurons in induced microgyria. *Brain Res*, 727 (1-2):71-78.
- Rosen GD, Jacobs KM, Prince DA. 1998. Effects of neonatal freeze lesions on expression of parvalbumin in rat neocortex. *Cereb Cortex*, 8 (8):753-761.
- Rosen GD, Herman AE, Galaburda AM. 1999. Sex differences in the effects of early neocortical injury on neuronal size distribution of the medial geniculate nucleus in the rat are mediated by perinatal gonadal steroids. *Cereb Cortex*, 9 (1):27-34.
- Rosen GD, Waters NS, Galaburda AM, Denenberg VH. 1995. Behavioral consequences of neonatal injury of the neocortex. *Brain Res*, 681 (1-2):177-189.
- Rosenzweig ES, Barnes CA. 2003. Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition. *Prog Neurobiol*, 69 (3):143-179.
- Sanes JN, Donoghue JP. 1997. Static and dynamic organization of motor cortex. *Adv Neurol*, 73:277-296.

- Sanes JN, Donoghue JP. 2000. Plasticity and primary motor cortex. *Annu Rev Neurosci*, 23:393-415.
- Sanes JN, Suner S, Lando JF, Donoghue JP. 1988. Rapid reorganization of adult rat motor cortex somatic representation patterns after motor nerve injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85 (6):2003-2007.
- Scantlebury MH, Ouellet PL, Psarropoulou C, Carmant L. 2004. Freeze lesion-induced focal cortical dysplasia predisposes to atypical hyperthermic seizures in the immature rat. *Epilepsia*, 45 (6):592-600.
- Schmidt S, Bruehl C, Hagemann G, Witte OW, Redecker C. 2006. Impairment of functional inhibition in the contralateral cortex following perinatally acquired malformations in rats. *Exp Neurol*, 201 (1):270-274.
- Shimizu-Okabe C, Okabe A, Kilb W, Sato K, Luhmann HJ, Fukuda A. 2007. Changes in the expression of cation-Cl⁻ cotransporters, NKCC1 and KCC2, during cortical malformation induced by neonatal freeze-lesion. *Neurosci Res*, 59 (3):288-295.
- Shojo H, Kibayashi K. 2006. Changes in localization of synaptophysin following fluid percussion injury in the rat brain. *Brain Res*, 1078 (1):198-211.
- Siren AL, Radyushkin K, Boretius S, Kammer D, Riechers CC, Natt O, Sargin D, Watanabe T, Sperling S, Michaelis T, Price J, Meyer B, Frahm J, Ehrenreich H. 2006. Global brain atrophy after unilateral parietal lesion and its prevention by erythropoietin. *Brain*, 129 (Pt 2):480-489.
- Spengler F, Godde B, Dinse HR. 1995. Effects of ageing on topographic organization of somatosensory cortex. *Neuroreport*, 6 (3):469-473.
- Stafstrom CE. 2006. Epilepsy: a review of selected clinical syndromes and advances in basic science. *J Cereb Blood Flow Metab*, 26 (8):983-1004.
- Walsh CA. 1999. Genetic malformations of the human cerebral cortex. *Neuron*, 23 (1):19-29.
- Wang H, Xie X, Li X, Chen B, Zhou Y. 2006. Functional degradation of visual cortical cells in aged rats. *Brain Res*, 1122 (1):93-98.
- Zilles K. 1985. *The Cortex of the Rat*. 1. Aufl. Berlin-Heidelberg. Springer-Verlag.
- Zilles K, Qu M, Schleicher A, Luhmann HJ. 1998. Characterization of neuronal migration disorders in neocortical structures: quantitative receptor autoradiography of ionotropic glutamate, GABA(A) and GABA(B) receptors. *Eur J Neurosci*, 10 (10):3095-3106.
- Zilles K, Dabringhaus A, Geyer S, Amunts K, Qu M, Schleicher A, Gilissen E, Schlaug G, Steinmetz H. 1996. Structural asymmetries in the human forebrain and the forebrain of non-human primates and rats. *Neurosci Biobehav Rev*, 20 (4):593-605.

9. ANHANG

9.1 Lebenslauf

Name: Martin Werner Metzler
Geburtsdatum/ -ort: 30. November 1983/Erfurt
Eltern: Marianne Metzler, geb. Kalwa
Werner Helmut Metzler
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig, keine Kinder

Schulbildung

1990 – 1994 Grundschohle 25 am Drosselberg/Erfurt
1994 – 2003 Pierre-de-Coubertin Gymnasium Erfurt (Sportschohle)

Zivildienst

Juli 2003 bis April 2004 Helios Klinikum Erfurt GmbH/Neurochirurgie

Hochschulstudium

2004 bis 2010 Studium der Humanmedizin an der FSU-Jena
November 2010 Approbation als Arzt

Promotion

2006 – 2009 Promotion in der Klinik für Neurologie/Jena in der Arbeitsgruppe „Plastizität“ von Herrn Prof. Dr. Otto W. Witte
Juni 2008 Teilnahme „Tag der Nachwuchswissenschaftler 2008“ des Forschungszentrums Lobeda/Jena
November 2008 Teilnahme und Posterpräsentation auf der Jahrestagung der „Society for Neuroscience“ in Washington/D.C., USA

9.2 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Otto W. Witte für die Überlassung des Themas. Außerdem danke ich Herrn Prof. Witte für die freundliche Bereitstellung der Arbeitsmöglichkeiten zur Durchführung der Experimente und die Begutachtung dieser Arbeit.

Sehr herzlich möchte ich mich bei Herrn Dr. Silvio Schmidt für die Anregung zu dieser Arbeit und die kontinuierliche und immer geduldige Betreuung bedanken. Er fand immer die richtigen Worte, schwierige Zeiten vergessen zu machen.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Christian Gaser vom Zentrum für Neuroimaging des Universitätsklinikums Jena für die Zusammenarbeit bei der Auswertung der volumetrischen MRT-Messungen.

Den Herren Dr. Karl-Heinz Herrmann, Prof. Dr. Jürgen Reichenbach und Frau Ines Krumbein danke ich für die Hilfe und die Bereitstellung der Arbeitsmöglichkeiten im Institut für Diagnostische und Interventionelle Radiologie des Universitätsklinikums Jena.

Weiterer Dank gilt allen technischen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „Experimentelle Neurologie“. Außerdem danke ich Frau Dipl.-Biologin Romy Zieger für die produktive und fröhliche Zusammenarbeit.

Danken möchte ich an dieser Stelle ebenfalls den Mitarbeitern des Instituts für Versuchstierkunde, insbesondere Frau John und Herrn Dr. Harald Schubert.

Der größte Dank gilt meinen Eltern. Ihr ermöglicht mir meinen Weg und unterstützt mich in allem aufopfernd.

9.3 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,
ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. Otto W. Witte, Dr. Silvio Schmidt,
die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,
dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und
dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, im März 2009

Martin Metzler

9.4 Tabellen

Tabelle 7: GFAP-Volumetrie (Werte in mm²)

Abschnitt	Gruppe	Alter	Volumen links	SEM	Volumen rechts	SEM
<i>I</i>	Kontrolle	3	30,19	1,09	29,77	0,67
	Dysplasie	3	29,09	1,26	28,55	1,97
	Kontrolle	26	33,10	0,99	30,77	0,90
	Dysplasie	26	32,40	1,09	30,78	1,18
<i>II</i>	Kontrolle	3	41,72	0,95	41,77	0,92
	Dysplasie	3	41,09	1,99	40,39	2,35
	Kontrolle	26	47,13	1,76	45,32	1,24
	Dysplasie	26	44,02	1,38	43,96	0,83
<i>III</i>	Kontrolle	3	51,67	1,31	50,78	1,36
	Dysplasie	3	49,16	2,21	48,75	2,55
	Kontrolle	26	55,47	2,35	53,86	2,24
	Dysplasie	26	55,32	3,48	52,92	2,44
<i>IV</i>	Kontrolle	3	54,98	2,00	59,54	1,22
	Dysplasie	3	60,23	1,29	56,71	2,25
	Kontrolle	26	57,81	2,52	59,80	3,04
	Dysplasie	26	58,21	1,31	60,84	1,03
<i>V</i>	Kontrolle	3	58,15	1,04	60,25	0,88
	Dysplasie	3	54,73	2,24	53,21	2,28
	Kontrolle	26	58,26	2,60	57,66	2,83
	Dysplasie	26	58,48	1,58	57,93	1,26

Tabelle 8: *ROD der immunhistochemischen Färbungen*

AG	Region	Gruppe	Alter	ROD links	SEM	ROD rechts	SEM
GFAP	Neokortex	Kontrolle	3	89,78	2,47	83,42	1,87
		Dysplasie	3	110,21	3,06	102,84	2,88
		Kontrolle	26	101,52	2,55	89,15	2,33
		Dysplasie	26	96,05	2,54	91,71	3,03
	Hippokampus	Kontrolle	3	185,36	6,67	184,06	4,70
		Dysplasie	3	191,16	4,84	183,09	4,72
		Kontrolle	26	191,08	3,15	184,28	2,89
		Dysplasie	26	194,72	2,96	194,96	2,94
	Thalamus	Kontrolle	3	63,82	5,93	62,85	5,27
		Dysplasie	3	99,04	6,55	91,62	5,51
		Kontrolle	26	89,41	4,69	83,33	4,54
		Dysplasie	26	75,56	4,44	74,65	4,29
SYN	Neokortex	Kontrolle	3	134,96	2,73	140,83	2,97
		Dysplasie	3	144,10	2,45	142,79	2,98
		Kontrolle	26	121,60	2,08	118,57	2,12
		Dysplasie	26	125,30	2,41	121,47	2,30
	Hippokampus	Kontrolle	3	127,03	6,07	131,90	4,31
		Dysplasie	3	139,46	3,83	138,70	3,29
		Kontrolle	26	109,47	3,04	112,55	3,10
		Dysplasie	26	115,71	3,22	116,10	2,69
	Thalamus	Kontrolle	3	70,75	7,12	77,16	6,94
		Dysplasie	3	79,74	4,60	80,96	4,11
		Kontrolle	26	62,20	2,94	63,16	2,50
		Dysplasie	26	70,55	3,33	72,32	2,60